

**Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen  
der Wechselwirkung von Peptiden und  
Proteinen mit Modellbiomembransystemen**

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

eingereicht beim  
Fachbereich Chemie  
der Universität Dortmund

von

**Sascha Janosch**

aus Herdecke

Dortmund 2004

Erstgutachter: Prof. Dr. R. Winter  
Zweitgutachter: Prof. Dr. J. P. Pohl  
Tag der mündlichen Prüfung: 08.10.2004

# Danke!

Mein besonderer Dank gilt zuallererst Herrn Prof. Dr. R. Winter für seine interessante Themenstellung und seine immer hilfreiche Diskussionsbereitschaft. Durch die zahlreichen mit der Arbeit verbundenen auswärtigen Aufenthalte war es möglich, viele interessante Erfahrungen zu sammeln.

Herrn Prof. Dr. J. P. Pohl danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Prof. Dr. E. Gratton und Dr. Th. L. Hazlett danke ich für die Betreuung während der Messaufenthalte am Laboratory for Fluorescence Dynamics (LFD). Die vielen lehrreichen Diskussionen haben entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Prof. Dr. J. L. Silva, Prof. Dr. J. A. Mignaco und Prof. Dr. C. F. L. Fontes danke ich für die kameradschaftliche Unterstützung und die tägliche Hilfestellung in besonderem Maße während meines Forschungsaufenthaltes in Rio de Janeiro. Sie boten mir die Möglichkeit, Erfahrungen im Umgang mit präparativen Methoden der Proteinbiochemie zu sammeln.

Frau Prof. Dr. E. Kinne-Saffran und Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. R. K. H. Kinne gilt mein besonderer Dank für die Unterstützung bei der Einarbeitung in ein für mich fachfremdes biologisches Arbeitsgebiet.

Für die ausgesprochen freundschaftliche und ungezwungene Atmosphäre möchte ich mich bei allen derzeitigen und ehemaligen wissenschaftlichen und nicht-wissenschaftlichen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Physikalische Chemie I bedanken. Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Heinz Herberhold, der mir während unserer gemeinsamen Zeit immer hilfreich als Freund zur Seite stand. Herrn Dr. Claus Czeslik danke ich für seine ständige Hilfsbereitschaft bei wissenschaftlichen Fragestellungen und für die angenehme Atmosphäre während unserer gemeinsamen Aufenthalte am LFD.

Mein ganz besonderer Dank gilt nicht zuletzt Daniela und meiner Familie, die mich auf meinem Weg begleitet, bestärkt und unterstützt haben.

---

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
2	Zell- und Biomembranen.....	4
2.1	Lipide .....	4
2.1.1	Phosphoglyceride .....	5
2.1.2	Sphingolipide.....	6
2.1.3	Steroide .....	6
2.2	Cholesterol.....	9
2.3	Gramicidin.....	11
2.4	Lipidierte Peptide .....	15
2.5	Die Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -ATPase.....	17
2.6	Riesige unilamellare Vesikel .....	21
2.7	Detergenzien .....	26
2.7.1	Klassifikation der Detergenzien .....	27
2.7.2	Entfernung von überschüssigem Detergens.....	27
2.8	Lipid Rafts .....	29
3	Methodik .....	30
3.1	Absorptionsspektroskopie .....	30
3.2	Fluoreszenzspektroskopie .....	33
3.2.1	Elektronische Anregung und Relaxation.....	33
3.2.2	Fluoreszenzcharakteristika.....	34
3.2.3	Energietransfer nach FÖRSTER .....	36
3.3	Fluoreszenzmikroskopie .....	38
3.3.1	Zwei-Photonenanregung.....	38
3.3.2	XY-Scanning .....	41
3.4	Fluorophore .....	42
3.4.1	LAURDAN .....	42
3.4.1.1	Das Konzept der verallgemeinerten Polarisation.....	44
3.4.1.2	Anwendungsgebiete .....	45
3.4.2	N-Rh-DPPE .....	45
3.4.3	BODIPY.....	46
3.5	Differential Scanning Calorimetry .....	50
4	Experimentelle Daten .....	51
4.1	Synthese der lipidierten Peptide.....	52
4.2	Anreicherung und Isolierung der Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -ATPase.....	55
4.2.1	Anreicherung der Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -ATPase.....	55
4.2.2	Isolierung der Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -ATPase .....	56
4.2.3	Aktivierung der Microsomen mit SDS.....	57

---

4.3	Fluoreszenzspektroskopie .....	60
4.3.1	Das Fluoreszenzspektrometer K2 .....	60
4.3.2	Proben für statische Fluoreszenzspektroskopie.....	63
4.3.3	Durchführung der Messungen .....	64
4.4	Fluoreszenzmikroskopie .....	65
4.4.1	Proben für die Fluoreszenzmikroskopie.....	67
4.4.2	Durchführung der Messungen .....	69
4.4.3	Auswertung der FM-Daten .....	70
4.5	Absorptionsspektroskopie .....	74
4.6	DSC-Messungen .....	74
4.6.1	Proben für DSC-Messungen .....	74
4.6.2	Durchführung der Messungen.....	74
4.7	Aktivitätsmessungen an der Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -ATPase .....	75
4.7.1	Nachweis von anorganischem Phosphat .....	76
4.7.2	Messung der Aktivität über das gekoppelte Enzym-Assay .....	76
4.7.3	Solubilisierung.....	77
4.7.4	Rekonstitution.....	77
5	Ergebnisse und Diskussion .....	78
5.1	Das binäre System DMPC/DSPC .....	78
5.2	DMPC/DSPC/Gramicidin .....	85
5.2.1	Fluoreszenzspektroskopie.....	85
5.2.2	Fluoreszenzmikroskopie.....	86
5.2.3	Diskussion .....	89
5.3	DMPC/DSPC/Cholesterol.....	90
5.3.1	Fluoreszenzspektroskopie.....	90
5.3.2	DSC-Messungen.....	91
5.3.3	Fluoreszenzmikroskopie.....	92
5.3.4	Diskussion.....	96
5.4	DMPC/DSPC/BL2 .....	97
5.4.1	Fluoreszenzspektroskopie.....	97
5.4.2	DSC-Messungen .....	102
5.4.3	Fluoreszenzmikroskopie.....	103
5.5	DMPC/DSPC/Cholesterol/BL2 .....	108
5.5.1	Fluoreszenzspektroskopie.....	108
5.5.2	Fluoreszenzmikroskopie.....	110
5.5.3	Diskussion.....	114
5.6	Einbau des Ras-Proteins N-Ras G12V181 .....	116

---

5.7	Aktivitätsmessungen an der Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -ATPase .....	118
5.7.1	Plasmamembran-Fraktion .....	118
5.7.2	SDS-aktivierte Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> ATPase .....	121
6	Zusammenfassung .....	125
7	Literatur .....	129

# 1 Einleitung

Lipide und Proteine sind die wesentlichen Bestandteile biologischer Membranen. Diese Membranen bestehen in den meisten Fällen aus einer Lipiddoppelschicht, die zu einer Kompartimentierung und damit zur Ausbildung einer Abgrenzung zwischen sehr unterschiedlichen Räumen führt. Die Entstehung dieser Abgrenzung durch die Zusammenlagerung von Molekülen war vermutlich der wichtigste Schritt auf dem Weg zur Entstehung der Urzelle, aus der sich dann im Laufe der Zeit die heutigen Zellformen entwickelt haben. Die Funktionen der Membran sind sehr vielseitig. Ein wichtiger Aspekt neben der Schutzfunktion ist dabei die Semipermeabilität der Membran, durch die wertvolle gebildete oder aufgenommene Nährstoffe und andere Biomoleküle in der Zelle verbleiben und somit dem Stoffwechsel zugeführt werden können. An dieser Stelle müssen dann spätestens auch die Proteine erwähnt werden, ohne die Leben in einer Zelle, wie wir es kennen, undenkbar wäre. Proteine sind an sämtlichen Stoffwechselfvorgängen im Organismus sowie an nahezu allen weiteren biologischen Funktionen beteiligt. Als Enzyme katalysieren sie biochemische Reaktionen, sorgen für den Transport von Ionen und Molekülen und sind für die Weitergabe der genetischen Information in Form der DNA verantwortlich. In Abhängigkeit ihrer Funktion sind die Proteine dabei entweder in die Lipiddoppelschicht der Membranen eingebaut oder befinden sich direkt in löslicher Form in der Zelle, wie z.B. im Zytosol oder im Blutplasma.

Den Lipiden wurde lange Zeit nur eine einzige wichtige Funktion zugeordnet. Nach dem Modell von SINGER und NICOLSON aus dem Jahre 1972 bilden sie eine Lipiddoppelschicht aus, in der sich die Lipidmoleküle bei einer für die richtigen physiologischen Bedingungen vorliegenden Temperatur in der flüssigkristallinen Phase befinden [SINGER 1972]. In diese Lipiddoppelschicht können dann die Proteine eingelagert (integrale Proteine) oder angelagert (periphere Proteine) werden. Dabei kann man sich die Lipiddoppelschicht als eine zweidimensionale Flüssigkeit vorstellen, in der die Proteine relativ frei diffundieren können. Demnach ist die Funktion der Lipide die Bereitstellung einer Umgebung, in der die Proteine ihre biologischen Funktionen ausüben können. Doch stellte sich bald die Frage, warum es dann eine so große Zahl von unterschiedlichen Lipiden gibt, wenn sie nur diese eine wichtige Funktion besitzen. Erst in den letzten Jahren sind neue Erkenntnisse zu dem Thema gewonnen worden. Dies hängt eng zusammen mit den so genannten „lipid rafts“. Dabei handelt es sich um bestimmte Bereiche in Lipiddoppelschichten, die reich an Cholesterol und dem Lipid Sphingomyelin sind. Die Verteilung der Lipide in den beiden Lipidmonoschichten ist dabei

unsymmetrisch. Durch Detergenzien, wie Triton, bei tiefen Temperaturen können diese nicht aufgelöst werden. In diesen Bereichen wurden zahlreiche Proteine gefunden, deren biologische Funktion möglicherweise erst nach Ansammlung in diesen Lipidstrukturen ermöglicht wird. Dies hat zu einer Erweiterung des Flüssig-Mosaik-Modells von SINGER und NICOLSON geführt, in dem nun die Lipiddoppelschicht nicht mehr als einfache homogene Umgebung für Proteine, sondern als heterogene Mikroumgebung mit sehr unterschiedlichen Eigenschaften angesehen wird [Edidin 2003]. Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Tatsache, dass diese heterogene Lipidumgebung einen Einfluss auf die Konformation und somit auf die Aktivität von Enzymen haben kann [Sankaram 1994, Dumas 1997, Schram 1997, Gil 1998, Curran 1999, Estra-Lopis 2000, Cornelius 2001].

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen Lipiden und verschiedenen biologisch relevanten Molekülen wie dem Gramicidin, dem Cholesterol und lipidierten Peptiden. Auf Grund der ungeheuren Komplexität natürlicher Membransysteme werden die Untersuchungen nicht an biologischen Membranen sondern an Modellbiomembranen durchgeführt. Gramicidin ist ein antibakterielles Polypeptid aus 15 Aminosäuren, das in Membranen Kanäle mit einer hohen Permeabilität für einwertige Ionen, wie  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$ , ausbildet. Die ungewöhnliche Struktur dieses Polypeptids sowie seine Fähigkeit, viele unterschiedliche Konformationen ausbilden zu können, haben zur Verwendung als einfaches Modellsystem für Ionenkanäle geführt. Cholesterol ist ein wichtiger Bestandteil von Biomembranen und führt unter anderem zur Erhöhung ihrer mechanischen Stabilität. Untersuchungen mit Cholesterol gibt es schon seit über 50 Jahren, jedoch sind viele Aspekte der Wechselwirkung mit den Lipiden noch weitestgehend ungeklärt. Die lipidierten Peptide gehören zu einer Klasse von Molekülen, die als Modellsysteme für bestimmte Membranproteine, wie z.B. das Ras, verwendet werden. Diese Proteine werden über lipidmodifizierte Peptidsequenzen des Proteins an die Membran gebunden. Eine typische Lipidmodifizierung stellt die Palmitoylierung und die Farnesylierung der Aminosäure Cystein dar. In diesem Zusammenhang wird auch der Einfluss der Lipidanker bei der Anreicherung in „lipid rafts“ diskutiert.

Die Untersuchung der lateralen Organisation der Lipide und Proteine in Membranen ist ein aktuelles Forschungsgebiet der Biophysik [Lipowsky 1995, Jörgensen 1993, 1995, 2000, Korlach 1999, Winter 1999]. Besondere Aufmerksamkeit wird dabei der Frage nach der Existenz von Lipid-Domänen und dem Zusammenhang zwischen Konformation und funktionellen Eigenschaften von Membranproteinen gewidmet [Hinderliter 2001, Davies 2001, May 2000, Heerklotz 2003, Simons 1997, van der Goot 2001]. Die Fluoreszenzmikroskopie hat sich dabei in den letzten Jahren als eine sehr geeignete Methode zur Darstellung der lateralen Struktur von

Lipiden in Modellbiomembranen erwiesen. Zu diesem Zweck werden „Giant unilamellar Vesicles“ (GUV) verwendet, die eine Größe von  $\sim 30 \mu\text{m}$  besitzen und somit gut mikroskopierbar sind. Die Erweiterung der Fluoreszenzmikroskopie durch die Zwei-Photonenanregung und die Verwendung geeigneter Fluorophore erlaubt die Detektion von Phasenkoexistenzgebieten in den GUV als Funktion der Temperatur und unter dem Einfluss der verschiedenen Komponenten. Mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie können zusätzlich detaillierte Informationen über den Phasenzustand der Lipide gewonnen werden.

Der zweite Teil dieser Arbeit befasst sich mit dem Enzym  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase. Dieses Enzym ist verantwortlich für die Aufrechterhaltung von Ionengradienten von  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  über die Zellmembran, die wichtig für die Prozesse der Reizweiterleitung sowie für Transportvorgänge sind. Detaillierte Untersuchungen an diesem Enzym gestalten sich meist recht schwierig, da zur Isolierung einer ausreichenden Menge an Enzym eine groß angelegte Präparation aus z.B. den Nieren von Schweinen durchgeführt werden muss. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher in Zusammenarbeit mit verschiedenen Arbeitsgruppen die Isolierung des Enzyms in einer ausreichenden Menge durchgeführt und ein Testsystem für die Messungen an der  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase entwickelt. Ziel der ersten biophysikalischen Experimente an diesem System ist die Aufklärung des Mechanismus der Inaktivierung des Enzyms durch hydrostatischen Druck und der Einfluss der Lipidumgebung (Heterogenität, Domänenstruktur, Phasenzustand, laterale Krümmungsenergie) auf die Funktion des Enzyms. Die Anwendung von Druck ermöglicht dabei die Untersuchung des Einflusses von Wechselwirkungen, die allein auf Volumeneffekte durch die Änderung der Dichte im System beruhen. Den Abschluss bilden erste Experimente zur Rekonstitution der  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase.

## 2 Zell- und Biomembranen

Interdisziplinäre Forschungsarbeiten sind oftmals wichtig, um die noch ungelösten Probleme von Struktur und Funktion von Membranen zu lösen. Dabei geht es hauptsächlich um die Charakterisierung der zwei Hauptkomponenten, nämlich den Proteinen und den Lipiden. Den Membranproteinen wird dabei im Allgemeinen eine größere Aufmerksamkeit zu teil als den Lipiden, weil diese scheinbar nur die hydrophobe Umgebung für die Proteine darstellen. Zahlreiche Antworten auf die Frage nach der Bedeutung der Lipide konnten jedoch in den letzten Jahren gewonnen werden, wie z.B. die Rolle bei Signaltransduktionsprozessen. Eine große Anzahl weiterer Beispiele für die Bedeutung der Lipide ist der Grund für ein wieder steigendes Interesse an der Lipidforschung.

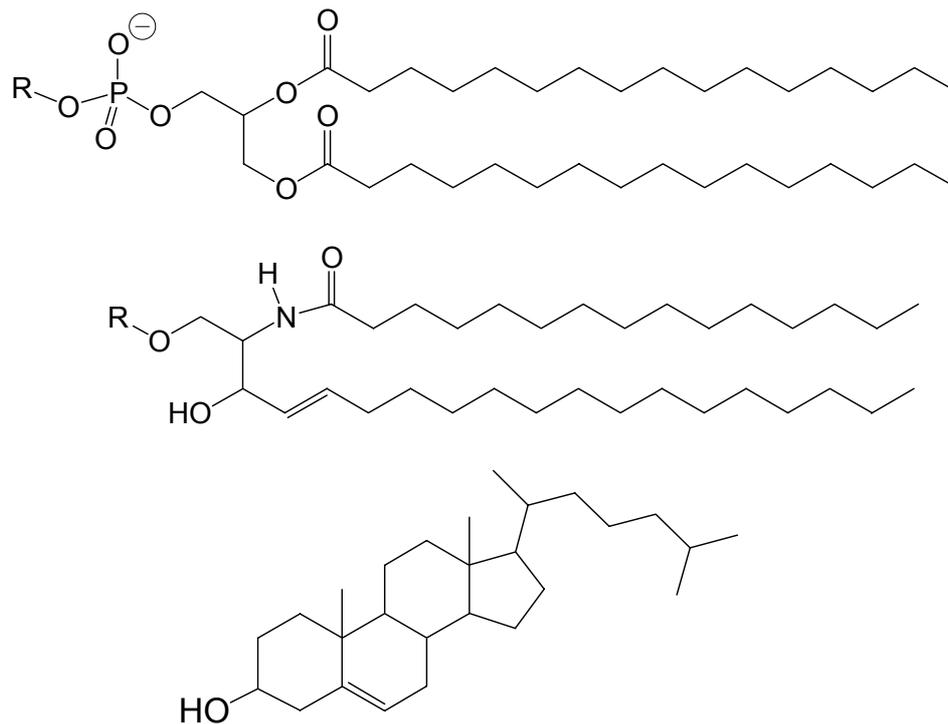
Im Folgenden sollen die wichtigen Komponenten von Zell- und Biomembranen sowie die in dieser Arbeit verwendeten Peptide und Proteine näher vorgestellt werden.

### 2.1 Lipide

Der Begriff Lipid beschreibt eine große Gruppe von Biomolekülen, deren gemeinsame Eigenschaft es ist, in Wasser nahezu unlöslich zu sein, jedoch mit relativ unpolaren Lösungsmitteln, wie Chloroform und Ether, aus biologischen Zellen extrahiert werden zu können. Dabei wird der überwiegende Teil der Lipide in den Membranen der Zellen gefunden, nur ein geringer Teil an anderen Orten in der Zelle. Lipide können grundsätzlich in zwei Gruppen unterteilt werden:

- a) Verseifbare Lipide, beinhalten Fettsäuren.
- b) Nicht verseifbare Lipide, beinhalten keine Fettsäuren.

Die verseifbaren Lipide unterscheiden sich dabei in der Struktur des Rückgrats, an das die Fettsäuren kovalent gebunden sind. In Geweben und Zellen existieren nur Spuren von freien Fettsäuren. Es existieren über 100 verschiedene Typen in der Natur, davon sind bei den Gesättigten das Palmitin ( $C_{16:0}$ ) und das Stearin ( $C_{18:0}$ ) am häufigsten vorhanden, bei den Ungesättigten das Olein ( $C_{18:1}$ ). Der Schmelzpunkt der Fettsäuren ist stark abhängig von der Kettenlänge und vom Sättigungsgrad. Abb. 2.1 zeigt die Strukturen einiger typischer Lipide.



**Abbildung 2.1** Strukturformeln wichtiger Membranlipide. Oben: Phospholipid (R = H, Ethanolamin, Cholin, Serin). Mitte: Sphingolipid (R = H, Phosphocholin, Glucose etc.). Unten: Cholesterol.

### 2.1.1 Phosphoglyceride

Die Phosphoglyceride bilden die Hauptgruppe der Membranlipide. Die terminale Hydroxylgruppe von Glycerin ist verestert durch Phosphorsäure, die anderen beiden Hydroxylgruppen durch Fettsäuren. Sie werden sehr häufig auch als Phospholipide oder Phosphatide bezeichnet. Die so gebildete Phosphatidsäure (PA) kommt in der Natur nur in geringen Mengen vor, ist aber ein wichtiges biosynthetisches Intermediat. Die Phosphoglyceride variieren untereinander in der polaren Kopfgruppe, die an die Phosphorsäuregruppe der PA gebunden wird. Das Vorhandensein dieser polaren Kopfgruppe zusammen mit den unpolaren Fettsäuren in einem Molekül ist der Grund für den amphipatischen Charakter dieser Biomoleküle.

Die Phosphatidylcholine sind die am häufigsten vorkommende Form der Phospholipide in Tieren, höheren Pflanzen und Hefen. Sie beinhalten Cholin als Kopfgruppe. Die zweite wichtige Gruppe bilden die Phosphatidylethanolamine mit Ethanolamin als Kopfgruppe, wobei diese Lipide die Hauptbestandteile der Membranen von Bakterien sind. Phosphatidylserine kommen sehr häufig in den Erythrocytenmembranen vor und haben das Serin als Kopfgruppe. Eine größere Bedeutung haben auch noch Phosphoglyceride mit dem Zucker Inositol oder dem Glycerin als Kopfgruppenmolekül.

### 2.1.2 Sphingolipide

Sphingolipide sind sehr komplexe Lipide aus dem Gehirn und dem Nervengewebe von Tieren sowie wichtige Bestandteile der Membranen von Pflanzen- und Tierzellen. Sie beinhalten kein Glycerin, sondern den Aminoalkohol Sphingosin oder ein Derivat als Rückgratstruktur. Die Aminogruppe vom Sphingosin wird dabei über eine Amidbindung mit einer Fettsäure verknüpft zu den so genannten Ceramiden, der typischen Struktur der Sphingolipide. Wird Phosphorylcholin oder Phosphorylethanolamin an die C1-Hydroxylgruppe der Ceramide gebunden, entsteht die wichtige Gruppe der Sphingomyeline.

### 2.1.3 Steroide

Die Steroide sind im allgemeinen Derivate des Perhydrocyclopentanophenanthren, einem tetrazyklischen Kohlenwasserstoff. Ihnen werden eine Vielzahl von Funktion zugeschrieben, unter anderem sind das Cholesterol und das Ergosterol wichtige Bestandteile der Zellmembranen von Tieren und Pilzen. In Bakterien dagegen kommen keine Sterole vor.

Lipide bilden in wässrigen Lösungen auf Grund des „hydrophoben Effektes“ Aggregate. Die Wassermoleküle orientieren sich unter Bildung einer maximalen Zahl von Wasserstoffbrückenbindungen um das Lipidmolekül. Die Ausbildung dieser geordneten Wasserstruktur ist mit einer Entropieabnahme des Wassers verbunden und somit ein ungünstiger Prozess. Enthalpische Effekte sind hier nur von untergeordneter Bedeutung. Ein weiteres Lipidmolekül führt nun nicht zur Ausbildung eines zweiten Wasserkäfigs, sondern die beiden Lipidmoleküle lagern sich in einem einzigen Wasserkäfig zusammen.

Die von den Lipiden gebildeten Mesophasen besitzen eine ausgesprochene Strukturvielfalt. Ein einfaches Modell zur Vorhersage ihrer Struktur ist der kritische Packungsparameter  $CPP$ . Dieser bedient sich geometrischer Faktoren und ist definiert als:

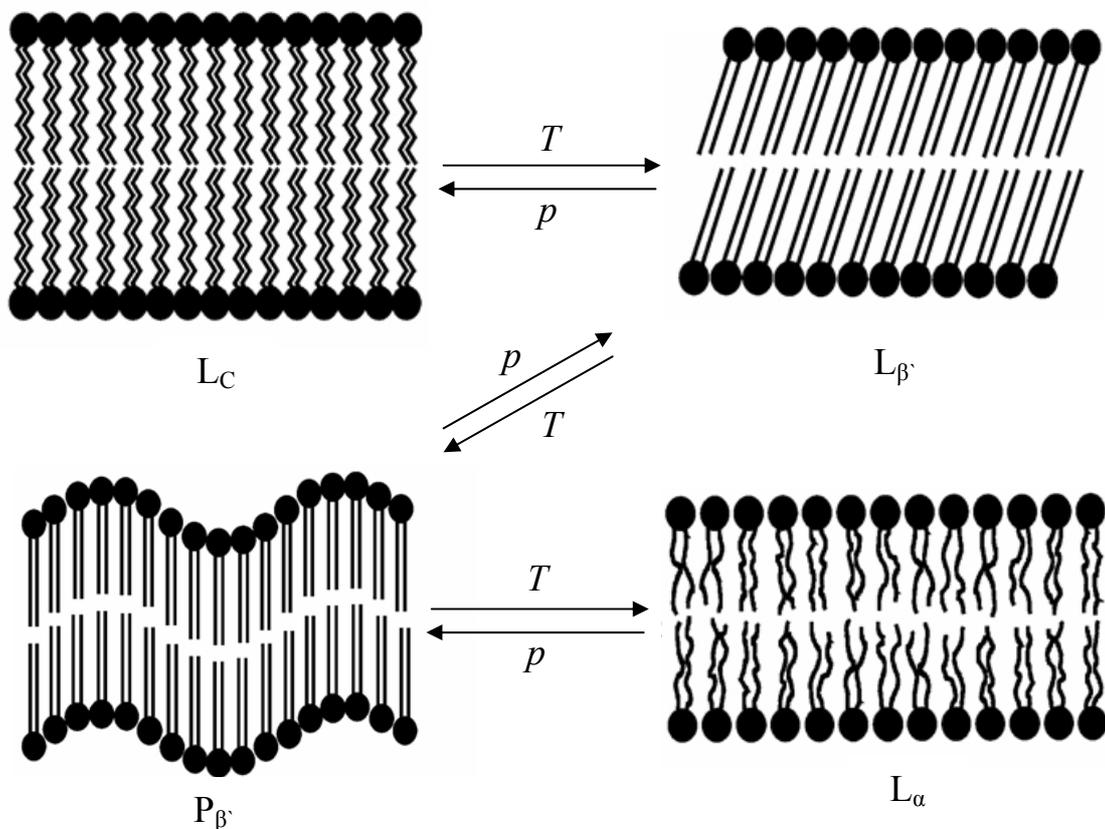
$$CPP = \frac{V}{A \cdot l} \quad (2.1)$$

Diese dimensionslose Größe gibt das Verhältnis des hydrophoben Kettenvolumens  $V$  zur Querschnittsfläche  $A$  der Kopfgruppen und normiert auf die Kettenlänge  $l$  an. Kegelförmige Moleküle, die ein kleines Kettenvolumen bei großem Flächenbedarf der Kopfgruppe haben ( $CPP < 0,33$ ), bilden bevorzugt Kugelmizellen, z.B. Natriumdodecylsulfat (SDS). Zylinderförmige Moleküle, die einen Packungsparameter zwischen 0,5 und 1 aufweisen, bilden hingegen Lipiddop-

pelschichten, wie z.B. die Phosphatidylcholine. Ungesättigte Phosphoglyceride mit großem Raumbedarf der Acylketten ( $CPP > 1$ ) lagern sich zu inversen Mizellen zusammen.

Neben der Molekülgeometrie ist jedoch auch noch das Wechselspiel von attraktiven und repulsiven lateralen Wechselwirkungskräften von großer Bedeutung. Neben der Ausbildung von lamellaren Phasen kann es durch Krümmung auf Grund von Wechselwirkungen zwischen benachbarten Kopfgruppenmolekülen zur Bildung von hexagonalen Lipidphasen kommen, meistens als inverse hexagonale Phase. Einen Kompromiss zwischen Krümmung und Packung stellt dabei die Ausbildung einer kubischen lamellaren Lipidphase dar, wie sie z.B. bei Monoacylglycerinen beobachtet wird. Näher soll auf diese Phasen aber nicht eingegangen werden, da für diese Arbeit ausschließlich die klassischen lamellaren Lipidphasen von Bedeutung sind.

Wie schon oben erwähnt, sind die Phosphoglyceride oder Phospholipide die Hauptbestandteile der Zellmembranen. Aus diesem Grund werden sie besonders häufig als Modellbiomenbranen in biophysikalischen Experimenten verwendet. In wässrigen Lösungen bilden sie spontan Lipiddoppelschichten, die sich ab einem Wassergehalt von  $\sim 30$  Gew.% zu Vesikeln (Liposomen) zusammenschließen.



**Abbildung 2.2** Schematische Darstellung verschiedener lamellarer Lipidphasen von Phospholipiden.

In diesen meist multilamellaren Gebilden sind die 4-5 nm dicken Lipiddoppelschichten durch eine 1-2 nm dicke Wasserschicht voneinander getrennt. Durch die Behandlung mit Ultraschall oder die Verwendung von Extrusionsmethoden können auch unilamellare Vesikel hergestellt werden. Solche Modellbiomembranen zeigen ein charakteristisches thermotropes und barotropes Phasenverhalten und die Struktur der gebildeten Phasen erfährt unter dem Einfluss von Temperatur und Druck signifikante Veränderungen. Abbildung 2.2 zeigt schematisch verschiedene lamellare Phasen von Phospholipiden.

Nach Inkubation für längere Zeit bei tiefen Temperaturen bildet sich aus einer Phospholipid-dispersion die Sub-Gelphase  $L_C$  aus. Sie ist durch eine starke Einschränkung der Rotation der Kohlenwasserstoffketten gekennzeichnet, die in einem orthorhombischen Gitter kristallin angeordnet sind. Durch Erhöhung der Temperatur erfolgt der Übergang in die  $L_{\beta'}$ -Phase, in der die Ketten um  $\sim 30^\circ$  zur Membrannormalen geneigt sind und eine verzerrte, quasi-hexagonale Packung aufweisen. Die bei erneuter Erhöhung der Temperatur erfolgende Phasenumwandlung in die  $P_{\beta'}$ -Phase wird als Vorübergang bezeichnet. Diese Phase ist gekennzeichnet durch eine wellige Überstruktur der lamellaren Doppelschicht und ein reguläres hexagonales Gitter der Kohlenwasserstoffketten mit einer leichten Neigung zur Membrannormalen. Die Gelphasen  $L_{\beta'}$  und  $P_{\beta'}$  weisen im Wesentlichen eine gestreckte Anordnung der Ketten auf, d.h., sie liegen überwiegend in der *all-trans*-Konformation vor. Dies führt zu einer relativ großen Dicke der Lipiddoppelschicht. Durch eine weitere Temperaturerhöhung entsteht schließlich durch die Bildung von *gauche*-Konformeren in den Alkylketten der Lipidmoleküle die flüssigkristalline  $L_{\alpha}$ -Phase. Dieser Vorgang wird als „Schmelzen“ der Ketten bezeichnet, die dazugehörige Phasenumwandlung als Hauptübergang. Die Lipidmoleküle sowie die Membranproteine besitzen in dieser Phase ein hohes Maß an Beweglichkeit und somit relativ hohe laterale Diffusionskoeffizienten. Dies ist Voraussetzung für die physiologische Funktion von Zellmembranen.

## 2.2 Cholesterol

Häufig ist die Membrankomponente Cholesterol nur im Zusammenhang mit Herz-Kreislauf-Beschwerden, wie der Arteriosklerose, bekannt. Dabei wird oft nicht beachtet, dass Cholesterol zahlreiche wichtige Funktionen im Organismus ausübt. Zu den beiden Hauptfunktionen gehören die Rolle als Bestandteil der Zellmembranen sowie die Beteiligung bei der Resorption von Fettsäuren im Darm. Neuerdings ist noch eine weitere wichtige Funktion des Cholesterols aufgedeckt worden, und zwar ist es als posttranslationale Modifizierung kovalent an ein Protein zur Membranverankerung gebunden, das in Prozessen der Signaltransduktion während der embryonalen Entwicklung eine wichtige Rolle spielt [Porter 1996]. Seit mehr als einem halben Jahrhundert werden Untersuchungen zur Funktion von Cholesterol in biologischen Membranen durchgeführt. Dabei gab es einen Anstoß für neuere Forschungen durch die Arbeiten von Aloia et al. [Aloia 1993], die einen Zusammenhang zwischen der viralen Entwicklung des HIV und dem Verhältnis von Cholesterol zu Phospholipid der Plasmamembran in der Gastzelle aufzeigten. Trotz einer enorm großen Anzahl von Forschungsarbeiten gibt es bis heute kein vollständiges Bild über die Struktur und Dynamik von Modellbiomembranen mit Cholesterol. Dies ist eindeutig ein Beleg für die Komplexität der auftretenden Wechselwirkungen selbst in scheinbar einfachen Systemen.

Der Anteil an Cholesterol in den Zellemembranen höherer Lebewesen ist stark abhängig von der Art des Gewebes und variiert zwischen 4 und 50 mol% [Löffler 1998]. Der amphiphile Charakter des Moleküls entsteht einerseits durch das rigide tetrazyklische Grundgerüst mit der unpolaren Seitenkette und die Hydroxylgruppe andererseits. Cholesterol selbst bildet keine Doppelschichten aus, lagert sich aber bis zu einer maximalen Konzentration von 66 mol% in Phospholipiddoppelschichten ein [Huang 1999]. Der Einbau erfolgt mit der Hauptachse senkrecht zur Ebene der Membran, wobei es zur Ausbildung von hydrophoben Wechselwirkungen des unpolaren Molekülteils mit den Kohlenwasserstoffketten der Phospholipide kommt. Zusätzlich kann die Hydroxylgruppe temporär eine Wasserstoffbrückenbindung zur Carboxylgruppe der Estergruppierung ausbilden.

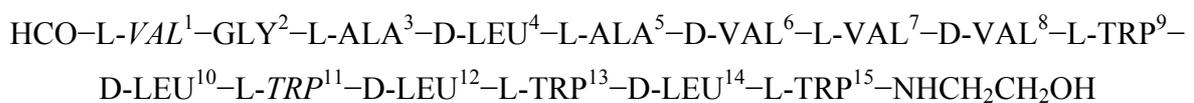
Der Einfluss von Cholesterol auf die physikalischen Eigenschaften der Membran ist sehr vielseitig. Auf der einen Seite wird für zahlreiche unterschiedliche Lipide die Konformationsordnung in der flüssigkristallinen  $L_\alpha$ -Phase durch die Ausbildung von trans-Isomeren erhöht, wodurch sich die lamellare Gitterkonstante gegenüber dem reinen Lipid und auch die mechanische Stabilität erhöht. Auf der anderen Seite induziert Cholesterol die Bildung von gauche-Konformeren in der Gelphase, wodurch sich die Ordnung der Alkylketten verringert. Dieser entgegengesetzte Ein-

---

fluss auf die verschiedenen Phasen führt dazu, dass die Konformationsänderungen am Hauptphasenübergang mit steigender Konzentration an Cholesterol immer geringer werden, bis bei ~ 50 mol% kein Phasenübergang mehr zu detektieren ist. Im mittleren Konzentrationsbereich entstehen statt dessen breite fluid/gel-Koexistenzgebiete. Bei hohen Konzentrationen existiert also nur eine homogene Phase, die sich durch eine hohe Konformationsordnung und eine große Fluidität der Membran auszeichnet. Die vorliegenden Erkenntnisse haben zur Klassifizierung zweier neuer Lipidphasen geführt, die als „liquid ordered“ ( $L_O$ ) und als „liquid disordered“ ( $L_D$ ) bezeichnet werden [Almeida 1993]. Besondere Bedeutung besitzen diese Phasen im Zusammenhang mit so genannten „lipid rafts“, auf die im Kapitel 2.8 noch näher eingegangen wird.

## 2.3 Gramicidin

Gramicidin ist ein Transportantibiotikum gegen grampositive Bakterien, woher es auch seinen Namen hat. Isoliert wird es aus dem Bodenbakterium *Bazillus Brevis* und wurde früher bei Verbrennungen eingesetzt. Die antibiotische Wirkung beruht auf der Bildung von Kanälen in der Membran, die nur für monovalente Kationen durchlässig sind. Gramicidin ist ein Polypeptid aus 15 alternierenden D- und L-Aminosäuren, ausgenommen das achirale Glycin an Position 2. Die Aminosäuresequenz von Gramicidin A ist in Abbildung 2.3 dargestellt.



**Abbildung 2.3** Aminosäuresequenz von Gramicidin A.

Natürliches Gramicidin liegt in Form einer Mischung verschiedener genetischer Varianten vor, die als Gramicidin D (GD) bezeichnet wird. Hauptbestandteil ist zu 80% das Gramicidin A. In den genetischen Varianten vom Gramicidin ist beim Gramicidin B das L-Tryptophan an Position 11 durch L-Phenylalanin ersetzt, beim Gramicidin C durch L-Tyrosin [Burkhart 1999, Sarges 1965]. Ein kleiner Teil der Gramicidinmoleküle enthält des Weiteren die Aminosäure L-Isoleucin anstatt L-Valin an Position 1. In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten wird die natürliche Mischung GD verwendet, da Untersuchungen die Ausbildung strukturell äquivalenter Ionenkanäle von den drei Gramicidinvarianten gezeigt haben.

Die Struktur und Funktion des Polypeptids werden entscheidend durch die Besonderheiten in der Primärstruktur geprägt. Gramicidin besitzt weder hydrophile noch geladene Aminosäuren, wodurch es nahezu unlöslich in wässrigen Lösungen, jedoch gut löslich in organischen Lösungsmitteln ist [Kemp 1972]. Ebenso kann es sich leicht in Biomembranen einlagern. Der N-Terminus ist durch eine Formylgruppe, der C-Terminus durch eine Ethanolamingruppe blockiert. Dadurch kann Gramicidin keine Oberflächenladung und auch kein Zwitterion ausbilden. Auf Grund der ungewöhnlichen Primärstruktur ist das Polypeptid in der Lage, ein Faltungsmotiv auszubilden, das ähnlich dem eines  $\beta$ -Faltblattes ist und bei dem alle Reste der Aminosäuren auf einer Seite des Faltblattes liegen. Trotz seiner sehr geringen Größe zeigt Gramicidin einen ausgeprägten Polymorphismus, wobei alle bisher charakterisierten Konformationen die helikale Struktur eines  $\beta$ -Faltblattes aufweisen. Diese  $\beta$ -Helices können sowohl rechts- als auch linksgängig sein und sich in der Zahl der Aminosäuren pro Windung unterscheiden [Urry 1971, Wallace 1986, 1990, 1998, Killian 1988, 1992, Koepe 1996]. Dies führt zu deutlichen Unterschieden in der Länge

und dem Durchmesser der Konformationen. Einzelstranghelices vom Gramicidin werden nur durch intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert. Durch Bildung von Dimeren, bei denen die N-Termini miteinander wechselwirken, entsteht eine Konformation, bei der die Membran vollständig durchdrungen wird. Diese Konformation wird als helikales Dimer (HD) oder auch als Kanalform bezeichnet. Neben den Einzelstrang-Helices können auch Doppelstrang-Helices gebildet werden, wobei die Stränge sowohl parallel als auch antiparallel angeordnet sein können [Wallace 1998, Veatch 1974, Pascal 1993, Langs 1991, Sychev 1993, Bouchard 1993]. Diese Dimere werden durch intermolekulare Wasserstoffbrücken stabilisiert und als doppelhelikale Form (DH) oder auch Porenform bezeichnet. Neben der NMR-Spektroskopie wird überwiegend die FTIR-Spektroskopie zur Aufklärung der GD-Konformation verwendet [Byler 1986, Naik 1986a, 1986b, Bandekar 1992]. Tabelle 2.1 gibt einen Überblick über wichtige Daten der unterschiedlichen Konformationen.

**Tabelle 2.1** Übersicht verschiedener  $\beta$ -Helices, die von Gramicidin gebildet werden.

Bezeichnung	Aminosäuren pro Windung	Gangrichtung	Länge / Å	Literatur
Helikale Dimere (HD)				
$\beta^{4.4}$	4,4	rechts	-	Börger 2001
$\beta^{6.3}$	6,3	rechts	26	Wallace 1998
$\beta^{6.5}$	6,5	rechts	25	Ketchum 1997
Doppelhelikale Strukturen (DH)				
$\uparrow\downarrow\beta^{5.6}$	5,6	links	36	Wallace 1998
$\uparrow\downarrow\beta^{6.4}$	6,4	links	26	Doyle 1997
$\uparrow\downarrow\beta^{7.2}$	7,2	rechts	27	Burkhart 1998

Die Länge des helikalen Dimers  $\beta^{4.4}$  konnte bisher experimentell nicht bestimmt werden, auf Grund der geringeren Anzahl Aminosäuren pro Windung sollte sie aber länger sein als die  $\beta^{6.3}$ -Helix.

Gramicidin wurde und wird häufig auf Grund seiner Eigenschaften (z.B. die einfache Kristallisation) und seiner sehr guten Verfügbarkeit als Modellsystem für Experimente zur Ionenleitung an Kanälen eingesetzt. Dabei wurden zahlreiche Untersuchungen zur Bestimmung der Struktur von Gramicidin in Membranen durchgeführt, jedoch mit zum Teil sehr widersprüchlichen Ergebnissen. Die Wahl des Lösungsmittels bei der Präparation hat offensichtlich bereits einen entschei-

denden Einfluss auf die Konformation des Gramicidins in der Modellmembran; zusätzlich scheinen einige Konformationen ohne biologische Aktivität metastabil zu sein, wodurch es nach längeren Inkubationen bei moderaten Temperaturen zu Konformationsumwandlungen kommen kann.

Der genaue Zusammenhang zwischen der Konformation vom Gramicidin und seiner Funktion ist auch heute noch nicht geklärt, jedoch identifiziert die Mehrzahl der Autoren das helikale  $\beta^{6,3}$ -Dimer als die wichtigste aktive Form [Arseniev 1985, Cornell 1988, 1989, Cross 1997, Kovacs 1996, Quist 1998]. Die beobachteten Leitfähigkeitssprünge lassen sich im Allgemeinen durch das Öffnen und Schließen von Kanälen erklären, wobei diese Sprünge beim Gramicidin durch die Bildung und die Dissoziation der Dimere hervorgerufen werden. Im Falle des Gramicidins ist ein solcher Kanal für  $\sim 1$  s geöffnet und während dieses Zeitraumes passieren mehr als  $10^7$  Ionen den Kanal.

Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass die Dicke der Lipiddoppelschicht entscheidenden Einfluss auf die Konformation des Gramicidins hat. Dabei konnte beobachtet werden, dass auch mehrere Konformationen in einer Membran stabil sein können und somit ein Konformengleichgewicht anzunehmen ist. Änderungen im Phasenzustand der Lipide können dann zu Verschiebungen des Gleichgewichts führen, um den Effekt des „hydrophobic mismatch“ zu minimieren [Fahsel 2002].

Der Begriff „hydrophobic mismatch“ beschreibt allgemein die Situation, wenn sich die Dicke des hydrophoben Bereiches der ungestörten Lipiddoppelschicht von der eines Membranproteins unterscheidet [Killian 1998, Mouritsen 1993]. Das System hat dann verschiedene Möglichkeiten, diesen energetisch ungünstigen Zustand zu vermeiden, wobei grundsätzlich sowohl die Lipide als auch die Proteine dazu beitragen können. Proteine können sich unter Umständen durch Konformationsänderungen an die Unterschiede in der Dicke der hydrophoben Bereiche anpassen; GD ist dafür ein sehr gutes Beispiel. Durch selektive Lipidassoziation, die Ausbildung von gel/fluid-Koexistenzgebieten oder Domänen unterschiedlicher Zusammensetzung und Struktur können Lipide die Dicke der hydrophoben Schicht so anpassen, dass ein besseres Matching zwischen Lipid und Protein erreicht wird. Des Weiteren ist auch eine Anpassung durch Stauchung bzw. Streckung der Kohlenwasserstoffketten denkbar, wodurch sich die Dicke der Lipiddoppelschicht und auch die Querschnittsfläche der Lipide ändert.

Lange Zeit wurde angenommen, dass die Struktur des GD unabhängig vom Matching zwischen dem Peptid und den umgebenden Lipiden ist. Durch FTIR-spektroskopische Untersuchungen der Konformation des GD in unterschiedlichen Lipidsystemen konnte dies jedoch widerlegt werden

[Zein 2000, Börger 2001]. An den Systemen DMPC/GD und DSPC/GD soll dies kurz erläutert werden.

GD bewirkt z.B. im System DMPC/GD (5 mol%) eine Erhöhung der konformellen Unordnung sowohl in der Gel- als auch in der flüssigkristallinen Phase. Dies lässt sich durch eine Stauchung der Kohlenwasserstoffketten erklären, um den Unterschied in den hydrophoben Dicken ausgleichen zu können. Zusätzlich bildet sich ein breites Zweiphasengebiet zwischen 17 und 29 °C aus. DMPC besitzt in der Gelphase eine Dicke der hydrophoben Lipiddoppelschicht von 32 Å, in der flüssigkristallinen Phase nimmt sie um 4 Å ab [Gil 1998]. GD nimmt im DMPC drei verschiedene Konformationen ein, wobei bevorzugt das  $\beta^{4,4}$ -Dimer gebildet wird. Eine Erhöhung der Temperatur von 10 °C auf 35 °C führt zu keiner Änderung der bevorzugten Konformation des GD, d.h., der „hydrophobic mismatch“ ist über den gesamten Temperaturbereich sehr gering.

Ganz anders verhält sich GD in System DSPC/GD (5 mol%). In der Gelphase kommt es zu einer leichten Zunahme der Konformationsordnung, in der flüssigkristallinen Phase zu einer Zunahme der Unordnung. Das Zweiphasengebiet erstreckt sich zwischen 44 und 56 °C. GD liegt auch diesmal wieder in drei Konformationen vor, wobei bei Temperaturen unterhalb von 44 °C die doppelhelikale Struktur der antiparallelen  $\beta^{5,6}$ -Helix überwiegt. Dies lässt sich durch die gute Übereinstimmung der hydrophoben Dicken erklären, denn DSPC hat in der Gelphase eine Dicke von 36 Å [Gil 1998]. Eine Erhöhung der Temperatur führt zu einer Verringerung der hydrophoben Dicke des DSPC und somit zu einem größeren Mismatch, dem das GD durch eine zunehmende Ausbildung der  $\beta^{4,4}$ -Helix entgegenwirkt. In diesem Fall tragen Lipid und Peptid gemeinsam zur Reduzierung des Mismatches bei, denn das Lipid sorgt durch eine Zunahme der Unordnung in der fluiden Phase für eine weitere Verkürzung der hydrophoben Dicke.

## 2.4 Lipidierte Peptide

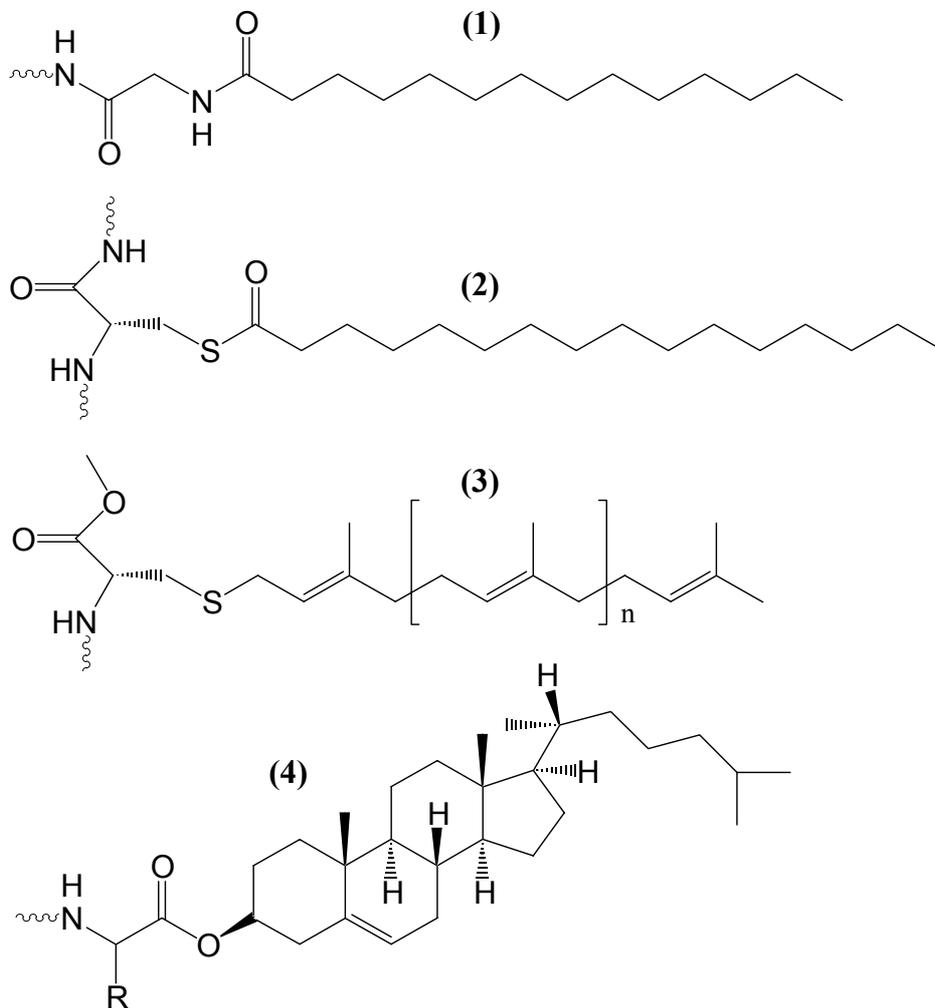
Virale und zelluläre Prozesse beinhalten einige Proteine, die durch kovalente Verknüpfung von Lipiden modifiziert sind. Diese Lipidmodifizierungen sind in der Regel essentiell für die Funktionstüchtigkeit des jeweiligen Proteins. Zelluläre Proteine mit Lipidmodifizierungen treten zum Beispiel in der Familie der Ras-Proteine, auf, einer Subfamilie der Ras-Superfamilie [Wittinghofer 2000]. Sie gehören zu den Guanin-Nukleotid-bindenden Proteinen. Diese sind an Signaltransduktionskaskaden beteiligt, durch die unter anderem die Zellteilung und die Zellentwicklung gesteuert werden [Geyer 1997]. Bei vielen Krebserkrankungen liegen Mutationen in genau diesen Biomolekülen vor, wodurch die Regulation der oben erwähnten Prozesse außer Kontrolle gerät. Man unterscheidet vier Arten von Lipidmodifikationen (s. Abb. 2.4):

- 1) Die Acylierung eines N-terminalen Glycins mit einer geradkettigen Fettsäure, überwiegend mit Myristinsäure [Resh 1999].
- 2) Die S-Acylierung von Cysteinen innerhalb eines Proteins, vornehmlich mit der Palmitinsäure [Resh 1999].
- 3) Die S-Prenylierung von Cysteinen am oder in der Nähe des C-Terminus mit Farnesyl- oder Geranylgeranylgruppen [Zhang 1996, Sinensky 2000].
- 4) Die Veresterung der C-terminalen Aminosäure mit Cholesterol [Porter 1996].

Die Hauptfunktion der Lipidmodifikationen ist die Regulierung der Membranassoziation von Proteinen. Durch die Einführung der Lipidreste erhöht sich die Hydrophobizität des Proteins und es ist in der Lage, sich an die Plasmamembran oder eine Membran von Zellorganellen zu binden. Dabei wird das Gleichgewicht zwischen zytosolischem und membrangebundenem Protein erst durch die Einführung von zwei Lipidresten deutlich auf die Seite des gebundenen Proteins verschoben [Shahinian 1995, Zacharias 2002]. Eine weitere mögliche Funktion der Lipidmodifikationen ist die direkte Wechselwirkung mit Proteinen, entweder durch direkte Interaktion oder auch durch Hervorrufen einer konformativen Änderung des modifizierten Proteins.

Bisher sind vier Arten von Ras-Proteinen bekannt: H-Ras, N-Ras, K-Ras<sub>4A</sub> und K-Ras<sub>4B</sub>, wobei die letzteren verschiedene Produkte des gleichen Gens sind. An ihrem C-Terminus enden sie mit einem farnesylierten Cysteinmethylester und weisen zusätzlich eine (N-Ras, K-Ras<sub>4A</sub>) beziehungsweise zwei (H-Ras) S-Palmitoylgruppen oder eine Polylysinsequenz (K-Ras<sub>4B</sub>) in der Nähe des C-Terminus auf. Mit Ausnahme dieses C-terminalen Bereiches aus ungefähr 25 Aminosäuren zeigen diese Proteine eine extrem hohe Sequenzhomologie. Der konservierte Teil ist

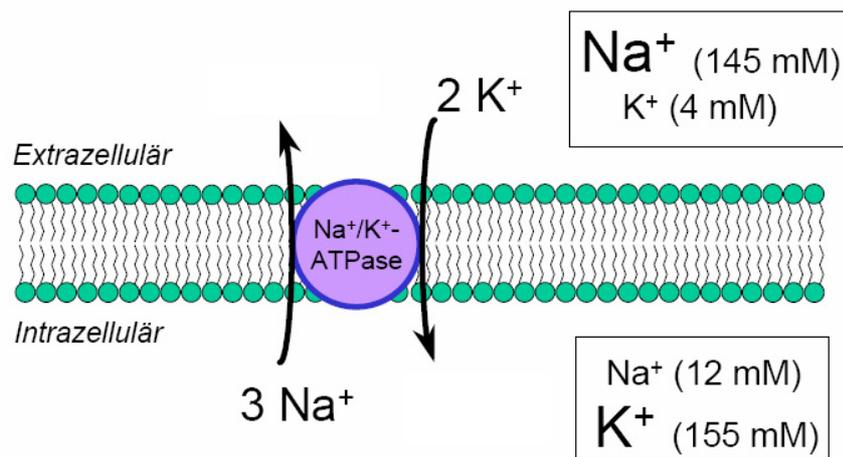
dabei für die Bindung an Effektoren und das Nukleotid verantwortlich, wo hingegen der C-Terminus für die Verankerung in der Membran sorgt.



**Abbildung 2.4** Strukturformeln der Lipidmodifikationen der Thiofunktion des Cysteins (1-3) sowie die Veresterung der C-terminalen Aminosäure mit Cholesterol (4).

## 2.5 Die Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase

In praktisch jeder Tierzelle ist die Na<sup>+</sup>-Konzentration geringer und die K<sup>+</sup>-Konzentration höher als im umgebenden Medium. Dieses Ungleichgewicht wird durch ein primäres aktives Transportsystem in der Plasmamembran erzeugt und aufrecht erhalten. Das Enzym Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase (EC 3.6.1.37), das Jens Skou 1957 entdeckt hat, koppelt den Abbau von ATP mit dem gleichzeitigen Transport von Na<sup>+</sup> und K<sup>+</sup> gegen ihren elektrochemischen Gradienten [Glitsch 2001]. Für jedes Molekül ATP, das in ADP und P<sub>i</sub> umgewandelt wird, transportiert das Enzym zwei Ionen K<sup>+</sup> durch die Plasmamembran in die Zelle und drei Na<sup>+</sup> aus der Zelle heraus. Dies führt zu einer Ladungstrennung an der Membran und damit zur Entstehung eines Membranpotenzials von -50 bis -70 mV, das für die meisten Tierzellen charakteristisch und für die Weiterleitung von Aktionspotenzialen in Nervenzellen essentiell ist.



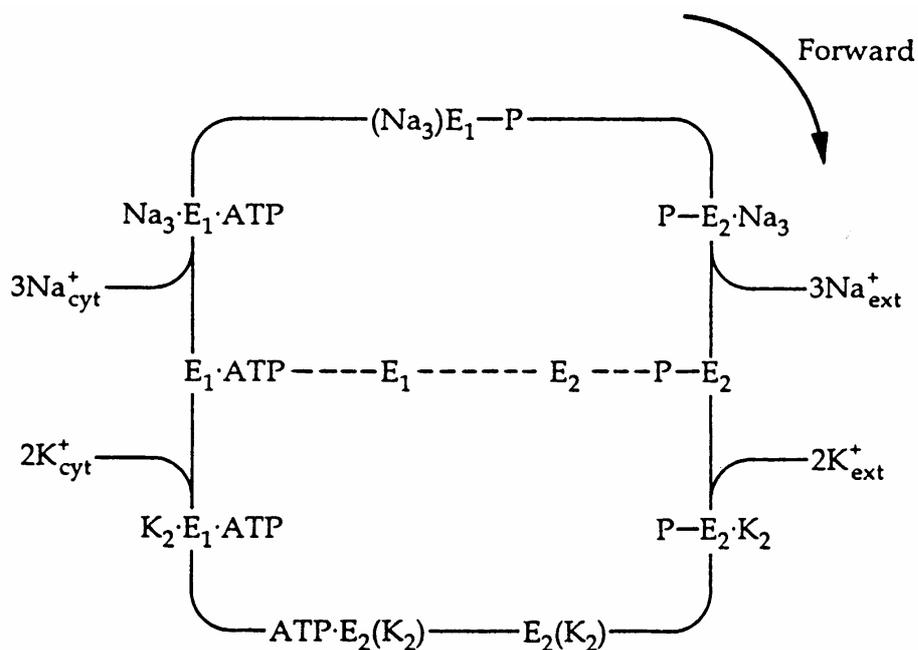
**Abbildung 2.5** Schematische Darstellung des Transportes von Ionen durch die Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase.

Ungefähr ein Drittel des in der Zelle gebildeten ATP wird für die Aufrechterhaltung bzw. Wiederherstellung dieses Membranpotenzials verbraucht; dies zeigt die zentrale Bedeutung der Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase. Durch das Steroidderivat Ouabain wird das Enzym sehr effektiv gehemmt. Zusammen mit einem weiteren Steroidderivat, dem Digitoxigenin, ist Ouabain der aktive Wirkstoff des Digitalis, eines Extraktes aus den Blättern des Fingerhuts. Digitalis wird in der Humanmedizin bei Herzinsuffizienz eingesetzt, da es den Na<sup>+</sup>-Ausstrom hemmt und so die Na<sup>+</sup>-Konzentration in den Zellen erhöht. Daraufhin wird im Herzmuskel ein Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>-Antiporter aktiviert und die Ca<sup>2+</sup>-Konzentration im Zytosol erhöht. Dies führt letztendlich zu einer verstärkten Kontraktion des Herzmuskels.

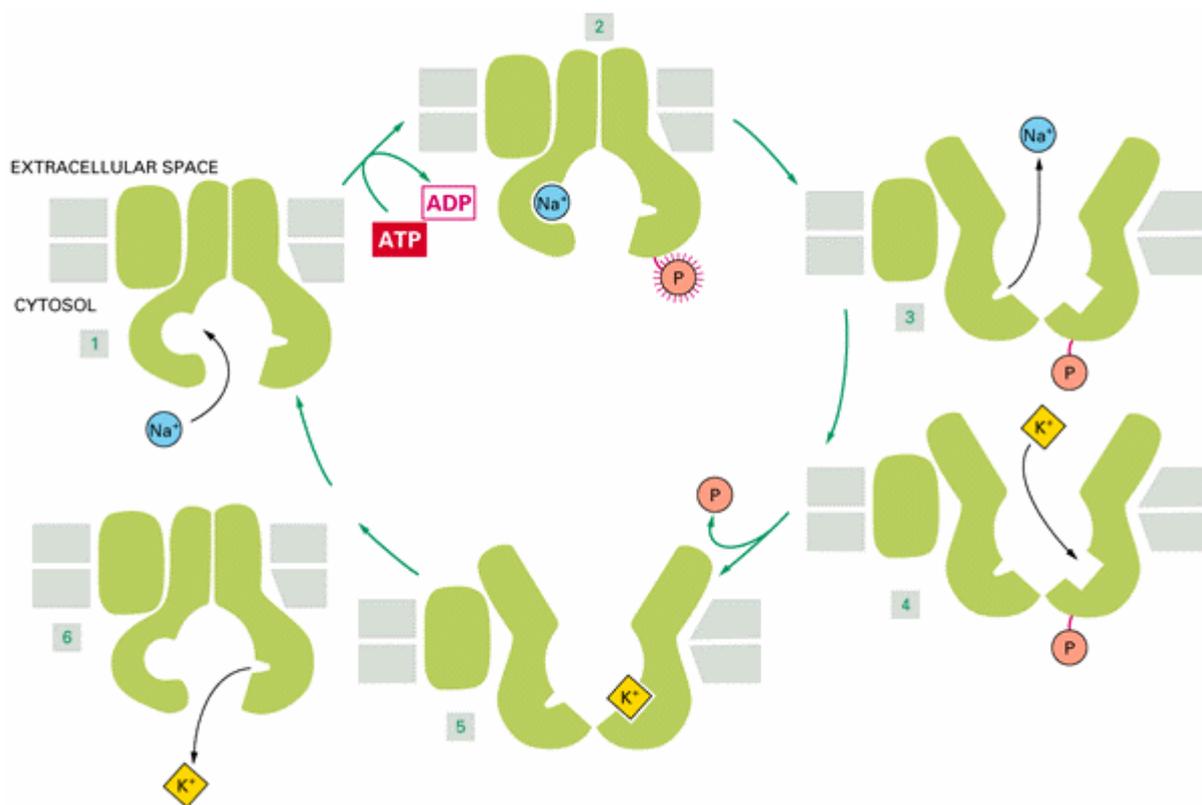
Die genaue dreidimensionale Struktur der Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase konnte bisher noch nicht aufgelöst werden, jedoch sind auf Grund der zahlreichen experimentellen Daten und der Strukturähnlichkeit mit der Ca<sup>2+</sup>-ATPase des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Reticulums (SERCA) detaillierte Modelle über den Mechanismus der Hydrolyse von ATP und den Transport der Ionen entwickelt worden [Heimburg 1997, Glitsch 2001, Artigas 2003].

Die Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase besteht aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit. Die  $\alpha$ -Untereinheit besitzt eine Molmasse von 110 kDa und beinhaltet die Bindestellen für die Ionen und den Inhibitor Ouabain. Die  $\beta$ -Untereinheit besteht aus einem glycosylierten Protein mit einer Molmasse von 35 kDa; die molekulare Masse der gesamten  $\beta$ -Untereinheit beträgt 56 kDa. Die  $\beta$ -Untereinheit spielt vermutlich eine wichtige Rolle bei der Bildung der aktiven Struktur sowie bei der Expression des Enzyms. Aktuell wird jedoch auch eine Beteiligung am Mechanismus des Ionentransportes diskutiert [Chow 1995]. Eine dritte Untereinheit mit bisher unbekannter Funktion, die als  $\gamma$ -Untereinheit bezeichnet wird und eine molekulare Masse von 6,5 kDa besitzt, ist eng mit der  $\alpha$ - und der  $\beta$ -Untereinheit verknüpft [Mercer 1993]. Die besondere Bedeutung dieser Untereinheit wird durch die Tatsache bestätigt, dass kleine Proteine bei vielen anderen ATPasen gefunden wurden. Das bekannteste Protein in diesem Zusammenhang ist das Phospholamban, dessen regulatorische Rolle bei der Ca<sup>2+</sup>-ATPase allgemein anerkannt wird. Kürzlich durchgeführte Studien haben gezeigt, dass die  $\gamma$ -Untereinheit in der Mehrzahl der Organismen nicht exprimiert wird. Überwiegend wird sie in Präparationen aus Nierengewebe gefunden. Daher wird ihr eine regulatorische Rolle bei der Salz-Reabsorption im Nierentrakt zugeschrieben [Therien 1999].

Aktuell geht man davon aus, dass die ATPase zwei Konformationen annehmen kann: eine phosphorylierte Form, die eine hohe Affinität für K<sup>+</sup> und eine niedrige für Na<sup>+</sup> besitzt (E1), sowie eine dephosphorylierte Form, die eine hohe Affinität für Na<sup>+</sup> und eine niedrige für K<sup>+</sup> aufweist (E2) [Glynn 1985]. Die Umwandlung von ATP zu ADP erfolgt in zwei Schritten, die durch die Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase katalysiert werden, und zwar (1) die Bildung des Phosphoenzyms und (2) die anschließende Hydrolyse. Abbildung 2.6 zeigt das Post-Albers-Schema der Reaktion. Eine illustrierte Darstellung des vermuteten Mechanismus ist in Abbildung 2.7 dargestellt.



**Abbildung 2.6** Post-Albers-Schema der Reaktion der  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase.



**Abbildung 2.7** Schematische Darstellung des vermutlichen Mechanismus des Ionentransportes durch die  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase.

Der hypothetische Transportprozess beginnt damit, dass aus dem Cytosol drei Na<sup>+</sup> an hoch affine Stellen der  $\alpha$ -Untereinheit binden. Durch die Phosphorylierung dieser Untereinheit ändert sich die Konformation des Enzyms und somit auch die Affinität für Na<sup>+</sup>, wodurch es auf der extrazellulären Seite freigesetzt wird. Dort bindet nun das K<sup>+</sup> an die hoch affinen Stellen, die Dephosphorylierung im Anschluss und die damit verbundene Konformationsänderung führt zur Freisetzung des K<sup>+</sup> im Zytosol. Der Transportzyklus kann nun erneut durchlaufen werden.

Die Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase wird durch die Anwendung von hydrostatischem Druck bis zu einem Druck von 2000 bar inaktiviert [de Smedt 1979, Chong 1985, Kato 2002]. Der Mechanismus der Inaktivierung ist jedoch bisher weitestgehend unverstanden, da die bisherigen Arbeiten zu unterschiedlichen Ergebnissen führten. Problematisch ist in diesem Zusammenhang auch der Unterschied in den Präparationen des Enzyms aus unterschiedlichen Organismen. Prinzipiell sind verschiedene Mechanismen denkbar:

- 1) Die Zunahme der Packungsdichte und der Ordnung in den Lipiden führt zu einer verringerten Beweglichkeit des Enzyms.
- 2) Eine Volumenänderung des Enzyms, unabhängig von den Lipiden.
- 3) Die Dissoziation der Untereinheiten.
- 4) Eine verringerte Substratbindung.

Druck im Bereich von einigen hundert bar führt zu einer drastischen Erhöhung der Ordnung in den Kohlenwasserstoffketten der Lipide und auch zur Phasenumwandlung in die Gelphase, wie schon für viele Modellmembranen und auch an Bakterien gezeigt wurde [Winter 2002, Ulmer 2002]. Ebenso konnte die Dissoziation von Untereinheiten in Proteinen beobachtet werden [Peniston 1971]. Der vermutete Mechanismus des Ionentransportes lässt auch den Einfluss von Volumenänderungen im Protein sowie eine verringerte Fähigkeit zur Bindung des Substrates vermuten.

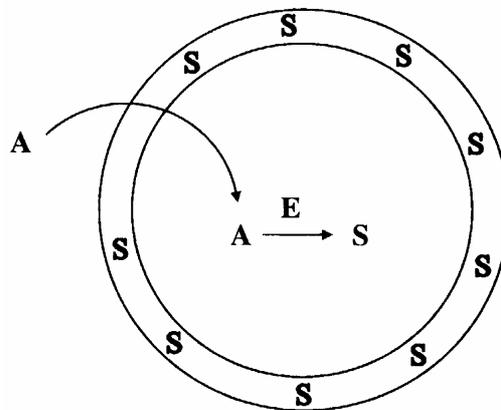
Die für die Zukunft geplanten Experimente sollen dabei helfen, zwischen diesen Mechanismen der Inaktivierung zu unterscheiden. Der Einfluss der Lipide kann dabei durch eine Rekonstitution des Enzyms in verschiedene Lipidumgebungen und die anschließende Korrelation des Phasenzustandes mit der Aktivität des Enzyms in Abhängigkeit des Lipids untersucht werden.

## 2.6 Riesige unilamellare Vesikel

Die Verwendung von riesigen unilamellaren Vesikeln (GUV) in biophysikalischen und biochemischen Untersuchungen hat in den letzten Jahren sehr stark an Bedeutung gewonnen. Die Gründe dafür sind sehr vielfältiger Natur und sind sowohl auf die verbesserten Verfahren zur Herstellung der Vesikel als auch auf neue experimentelle Techniken zu deren Untersuchung zurückzuführen.

GUV haben einen Durchmesser zwischen 10 und 100 nm, bestehen aus  $8 \cdot 10^8 - 8 \cdot 10^{10}$  Lipidmolekülen pro Vesikel und sind mit Ausnahme der Kristallisation die größte Form ihrer Selbstorganisation. Auf Grund ihrer Größe lassen sich die Bildung und das Verhalten mit einfachen Methoden wie der Lichtmikroskopie beobachten. Die hohe mechanische Stabilität sowie die sehr gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sind wesentliche Punkte für das Arbeiten mit GUV.

Auf Grund der Analogie von GUV mit Zellen werden die Vesikel als Vorstufe der Protozelle betrachtet und sind somit als Modellsysteme für die Untersuchung der Kompartimentierung und Ausbildung von Gradienten bestens geeignet. GUV sind auch die Grundlage vieler Versuche zur Beantwortung der Frage der Zellenstehung. Ziel ist dabei die Entwicklung eines Modells für die primitive metabolische Zelle (s. Abb. 2.8).



**Abbildung 2.8** Schematische Darstellung einer hypothetischen Minimalzelle. A wird zu S umgewandelt und bildet die Umrandung der Zelle. Die Umwandlung wird durch das Enzym E katalysiert.

GUV werden auch als Mikroreaktoren verwendet; durch Mikroinjektionstechniken können z.B. gezielt enzymkatalysierte Reaktionen im Inneren des Vesikels ablaufen. Problematisch sind in diesem Zusammenhang jedoch das geringe Volumen sowie die aufwendige Analyse der Reaktionsprodukte.

Große Bedeutung haben GUV in der Medizin und der Physiologie, z.B. zur Untersuchung der Muskelaktivität. Dazu werden Vesikel aus Membranen des Muskelgewebes präpariert und die

Aktivität des Glukose-Transporters untersucht. So konnte gezeigt werden, dass bei Bewegung die Konzentration an Glukose-Transporter in den Muskelzellen verdoppelt wird und nicht, wie vorher angenommen, die Pumprate zunimmt. Signalübertragungen und die Einflüsse von Toxinen können ebenfalls mit Hilfe von GUV untersucht werden. Hierfür werden Vesikel aus Plasmamembranen mit Acetylcholin hergestellt und anschließend der Einfluss verschiedener Toxine auf die Permeabilität des Neurotransmitters untersucht.

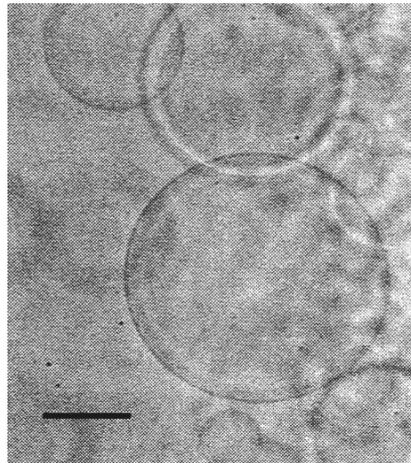
Große und riesige Vesikel entstehen oft als Nebenprodukte bei der Bildung kleiner Vesikel. Um den Anteil der großen und riesigen Vesikel zu vergrößern, wurden zahlreiche Präparationsverfahren ausgearbeitet, wobei typischerweise zwei Wege genommen werden:

- 1) Quellen von ultradünnen Lipidfilmen bei minimaler mechanischer Bewegung.
- 2) Fusion von zuvor gebildeten kleineren Vesikeln.

Eine der ersten Methoden zur Präparation von GUV wurde von REEVES und DOWBEN beschrieben [Reeves 1973]. Sie erzeugten einen dünnen Lipidfilm aus einem Gemisch aus Chloroform und Methanol. Nach dem Trocknen wurde dieser ohne Schütteln oder Bewegen hydratisiert. Das Ergebnis war eine sehr heterogene Dispersion. Als das Interesse an den GUV wuchs, wurden weitere Methoden und Verbesserungen entwickelt. Als Beispiele seien die Verwendung von rauen Teflonoberflächen, das Equilibrieren der Lipidfilme in einer feuchten Atmosphäre und das Verwenden des Spin Coatings zur Herstellung sehr dünner Lipidfilme genannt. Andere Methoden nutzen die Dialyse, Freeze-Thawing und die Dehydratation – Rehydratation von kleinen unilamellaren Vesikeln.

Ein neuer Ansatz zur gezielten Herstellung von GUV ist das Elektroswelling oder auch Elektroformation genannt, bei dem ein trockener Lipidfilm in einem elektrischen Feld hydratisiert wird [Angelova 1986]. Ausgangspunkt der Entwicklung dieser Methode waren die Bemühungen, ein Verfahren zu finden, mit dem in großer Ausbeute unilamellare Vesikel in der Größenordnung von Zellen hergestellt werden können. Erweiterungen und Optimierungen der oben erwähnten Methoden brachten zwar deutliche Verbesserungen in der Geschwindigkeit der Vesikelbildung und in der Größenverteilung der gebildeten Vesikel, jedoch war der Anteil der kleinen und mittleren Vesikel noch immer überwiegend.

Die Elektroformationsmethode, zuerst veröffentlicht von Angelova und Dimitrow [Angelova 1986], wurde sowohl für planparallele als auch zylindrische Kammergeometrien entwickelt. Dabei können sowohl elektrische Felder mit Gleich- oder Wechselspannung verwendet werden. Seitdem sind zahlreiche Weiterentwicklungen und Anwendungen erarbeitet und veröffentlicht worden, um für die verschiedenen Lipide und Lipidmischungen die geeigneten Parameter zur Liposomenbildung zu finden. Dabei können die Größe, die Lamellarität und die Ausbeute der gebildeten unilamellaren Vesikel durch die Dicke des eingesetzten Lipidfilms und die Parameter des angelegten elektrischen Feldes kontrolliert werden.



**Abbildung 2.9** GUVs aus DMPC in destilliertem Wasser, hergestellt durch die Methode der Elektroformation,  $T = 45\text{ °C}$ . Der Balken entspricht einer Länge von  $30\text{ }\mu\text{m}$ .

Der Aufbau eines Elektroformationsexperiments besteht aus der entsprechenden Kammer und einer Spannungsquelle. Mit einem optischen Phasenkontrastmikroskop ausgestattet, einem Objektiv mit einem großen Arbeitsabstand und einer Videokamera kann das Wachstum der Vesikel beobachtet werden. In vielen Fällen werden die Experimente direkt in der Kammer nach dem Wachstum durchgeführt.

Protokolle zur Bildung der GUV beinhalten grundsätzlich die drei folgenden Schritte:

- 1) Aufbringen eines dünnen trockenen Lipidfilms auf der Elektrodenoberfläche
- 2) Füllen der Kammer mit Wasser oder wässriger Pufferlösung und Anlegen des externen elektrischen Feldes.
- 3) Kontrolle des Vesikelwachstum durch die Parameter des elektrischen Feldes.

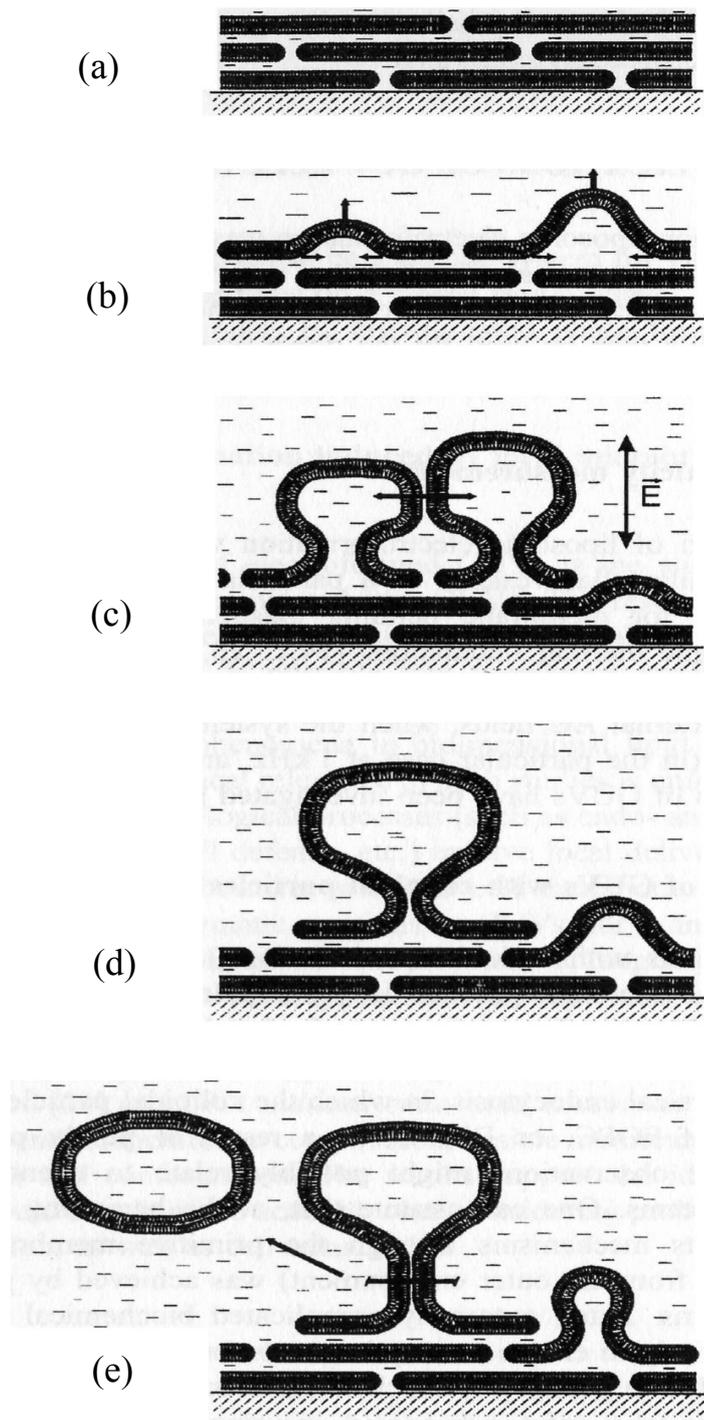
Die Elektroformationsmethode ist limitiert auf Ionenstärken unterhalb von  $10\text{ mM NaCl}$ ; schon die Anwesenheit von  $1\text{ mM Ca}^{2+}$  ist ausreichend, um die Vesikelbildung zu unterbinden. Die Wahl des organischen Lösungsmittels zum Aufbringen des Lipidfilms richtet sich nach der Art der verwendeten Lipide, bewährt haben sich Chloroform, Methanol und Diethylether sowie Mi-

schungen aus den drei Lösungsmitteln mit Lipidkonzentrationen zwischen 0,2 und 1,5 mg mL<sup>-1</sup>. Der Abstand der Platindrähte liegt zwischen 3 und 5 mm bei einem Durchmesser von 0,8 mm. Die Parameter für das elektrische Feld hängen stark von der Zellgeometrie ab und müssen experimentell optimiert werden.

Zur Durchführung von Untersuchungen an einzelnen GUV ist die Methode der Elektroformation sehr nützlich, außerdem wird auf Grund der wenigen Milligramm pro Präparation eingesetzten Menge Lipid nur sehr wenig Material benötigt. Die Frage nach der Unilamellarität lässt sich durch die Beobachtung der Kontur des Vesikels im Phasenkontrastmikroskop allein nicht beantworten; jedoch haben Experimente zur Bestimmung der Biegeelastizität sowie die Elektronenmikroskopie dies eindeutig bestätigt.

Bei der Planung von Experimenten an GUV, die durch die Elektroformationsmethode hergestellt werden sollen, ist unbedingt zu beachten, dass eine Voraussetzung für das Gelingen der Vesikelbildung das Vorliegen der Lipide in der fluiden Phase ist. Zur Herstellung von GUV aus dem Lipid DSPC sind z.B. Temperaturen > 60 °C erforderlich.

Die genauen Mechanismen der Bildung von GUV in einem elektrischen Feld sind noch nicht geklärt; mindestens 7 verschiedene Modelle sind bisher vorgeschlagen worden. Der dominierende Mechanismus der Elektroformation ist im Falle des Protokolls mit einer Frequenz von 10 Hz die periodische Bewegung des Wassers an der Wasser-Elektrodenrenzfläche. Schematisch ist dies in Abbildung 2.10 dargestellt. Diese Schwingungen sind senkrecht zur Elektrodenoberfläche gerichtet, auf der sich der Lipidfilm befindet (Abb. 2.10(a)). Lamellare Schichten werden von der Elektrode separiert und wachsen zu so genannten „Pilzen“ (Abb. 2.10(b)). Sie wachsen bis zu einer Größe von 10-20 µm, dies entspricht der Größe, die bei einer spontanen Bildung von quellenden Lipidfilmen erreicht wird. Auf dieser Stufe berühren sich die „Pilze“ gegenseitig ((Abb. 2.10(c)). Nach und nach vergrößert sich die Kontaktfläche, bis schließlich durch die Schwingungen die Kontaktfläche destabilisiert wird und es zur Fusion zu einem größeren Vesikel kommt (Abb. 2.10(d)).



**Abbildung 2.10** Schematische Zeichnung der Vesikelbildung nach der Methode der Elektroformation.  $E$  zeigt die Richtung des externen elektrischen Feldes an.

Nach ein paar Minuten wird aus dem „Pilz“ ein sphärisches Vesikel; es schließt sich und verliert gegebenenfalls den Kontakt zur Elektrode (Abb. 2.10(e)).

## 2.7 Detergenzien

Detergenzien sind amphiphile Moleküle, die aus einem polaren Kopf und einer langen hydrophoben Alkylkette, dem so genannten „Schwanz“ (Tail) bestehen. Die polaren Gruppen bilden Wasserstoffbrücken mit den Wassermolekülen aus, die Kohlenwasserstoffketten aggregieren auf Grund des hydrophoben Effektes. In wässrigen Lösungen bilden sie sphärische Mizellen und können daher hydrophobe Verbindungen solubilisieren. Phospholipide werden häufig als biologische Detergenzien bezeichnet, da der größte Teil der für Forschungszwecke verwendeten Detergenzien synthetischer Natur sind. Große Bedeutung haben Detergenzien bei der Isolierung von integralen Membranproteinen, da diese unlöslich in Wasser, aber löslich in Detergenzlösungen sind.

Die Solubilisierung von Membranproteinen durch Detergenzien beruht auf der Tatsache, dass die Detergenzmoleküle die Umgebung der Lipiddoppelschicht nachbilden. Mizellen aus Detergens sind den Lipiddoppelschichten sehr ähnlich und können so durch hydrophobe Wechselwirkungen Proteine einlagern. Dabei werden die hydrophoben Regionen des Membranproteins durch Detergens umgeben, wo hingegen die hydrophilen Bereiche dem wässrigen Medium zugewandt sind. Vollständiges Entfernen des Detergens kann auf Grund der Aggregation der hydrophoben Regionen zur Präzipitation der Membranproteine führen. Grundsätzlich können auch Phospholipide als Detergenzien eingesetzt werden, jedoch sind die gebildeten Vesikel auf Grund ihrer Größe nicht für die Isolierung und Charakterisierung von Membranproteinen geeignet.

Die Auflösung einer Membran durch Detergenzien kann in verschiedene Stufen unterteilt werden. Bei einer geringen Detergenzkonzentration binden die Detergenzmoleküle an die Membran und werden in die Doppelschicht eingebaut. Mit steigender Konzentration und Sättigung der Membran kommt es zur Bildung von gemischten Mizellen aus Detergens und Membranlipid. Man erhält schließlich Mizellen aus Detergens, aus Lipid gemischt mit Detergens, sowie den gewünschten Mizellen aus Membranprotein und Detergens, gewöhnlich mit nur einem Proteinmolekül pro Mizelle. Diese können dann von den übrigen Mizellen auf Grund ihrer Ladung, Größe oder Dichte getrennt werden.

### 2.7.1 Klassifikation der Detergenzien

Kommerziell ist eine große Anzahl von Detergenzien mit verschiedenen Kombinationen der hydrophilen und hydrophoben Gruppen erhältlich, die auf Grund der Natur der hydrophilen Kopfgruppe grob in ionische, nichtionische und zwitterionische Detergenzien unterteilt werden. Ionische Detergenzien besitzen eine Kopfgruppe mit einer Nettoladung, die positiv als auch negativ sein kann. Als Beispiel sei hier das SDS genannt, das als anionisches Detergens die Sulfatgruppe besitzt. SDS findet große Verwendung in der Gelelektrophorese.

Nichtionische Detergenzien beinhalten ungeladene, hydrophile Kopfgruppen, die entweder aus Polyoxyethylen-Gerüsten oder glycosidischen Gruppen bestehen. Im Allgemeinen sind nichtionische Detergenzien gut geeignet, um Lipid-Lipid- und Lipid-Protein-Wechselwirkungen zu reduzieren, weshalb sie häufig für die Isolierung von Membranproteinen in ihrer biologisch aktiven Form verwendet werden. Ein typisches Beispiel für ein solches Detergens ist das  $C_{12}E_8$ ,  $CH_3(CH_2)_{11}-O(CH_2CH_2O)_8-H$ .

Zwitterionische Detergenzien vereinen die Eigenschaften von ionischen und nichtionischen Detergenzien. Auf Grund der fehlenden Nettoladung fehlt ihnen die Leitfähigkeit sowie die elektrophoretische Beweglichkeit; wie ionische Detergenzien besitzen sie aber die Fähigkeit, Protein-Protein-Wechselwirkungen zu schwächen. Ein bekanntes Beispiel für ein zwitterionisches Detergens ist CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate).

Zu den wichtigen charakteristischen Eigenschaften der Detergenzien gehören zum einen die kritische Mizellkonzentration (CMC) und zum anderen die Aggregationszahl. CMC ist die niedrigste Konzentration, oberhalb der die Monomere Mizellen bilden; sie spielt eine große Rolle bei der Planung und Durchführung von Rekonstitutionsexperimenten von Membranproteinen. Die Aggregationszahl ist definiert als die Zahl der Detergensmonomere in einer einzelnen Mizelle.

### 2.7.2 Entfernung von überschüssigem Detergens

In Experimenten zur Isolierung von Membranproteinen wird Detergens häufig im Überschuss eingesetzt, um zum einen eine vollständige Auflösung der Membran zu gewährleisten und zum anderen nur ein Proteinmolekül pro Mizelle zu erhalten. Für die weitere physikochemische oder biochemische Charakterisierung der Membranproteine ist es oft notwendig, ungebundenes De-

tergens zu entfernen. Von den zahlreichen Methoden sollen nur die vier wichtigsten kurz erläutert werden:

#### *Hydrophobe Adsorption*

Diese Methode nutzt die Eigenschaft der Detergenzien, an hydrophobe Oberflächen zu binden. Dabei wird das Adsorbens zur Lösung gegeben und anschließend durch Zentrifugation oder Filtration wieder entfernt. Ein sehr häufig verwendetes Adsorbens sind die so genannten Bio Beads.

#### *Gelchromatographie*

Hierbei wird der Größenunterschied der verschiedenen Mizellen genutzt, um überschüssiges Detergens von den Mizellen mit eingebautem Protein zu trennen. Wichtig ist dabei die Verwendung einer Konzentration an Detergens unterhalb der CMC im Elutionspuffer, um eine Aggregation und Präzipitation der Proteine zu verhindern.

#### *Dialyse*

Verdünt man Detergenslösungen auf Konzentration kleiner als die CMC, dissoziieren die Mizellen in die Monomere. Auf Grund der sehr geringen Größe der Monomere können diese leicht durch Dialyse entfernt werden. Besonders für Detergenzien mit einer großen CMC ist die Dialyse häufig die Methode der Wahl.

#### *Ionenaustauschchromatographie*

Diese Methode nutzt den Ladungsunterschied zwischen Mizellen mit Protein und Detergens sowie Mizellen ohne Protein. Dabei werden die Bedingungen bei Verwendung von nichtionischen Detergenzien meist so gewählt, dass die Mizellen mit Protein adsorbieren. Das Protein kann dann durch Waschen mit Lösungen ohne Detergens eluiert werden. Alternativ kann das Protein auch durch die Verwendung einer ionischen Reagenzlösung eluiert werden, wodurch das nichtionische Detergens durch das ionische Detergens ersetzt wird.

## 2.8 Lipid Rafts

Lipide sind in den Doppelschichten der Plasmamembran unsymmetrisch zwischen der inneren und äußeren Schicht verteilt [van Meer 1989]. Dabei finden sich in der äußeren Schicht Bereiche aus Sphingolipiden und Cholesterol, die mit den in der inneren Schicht vorhandenen Phospholipiden und Cholesterol verbunden sind. Die Lipide in diesen Bereichen lassen sich durch Detergenzien, wie Triton, bei tiefen Temperaturen nicht auflösen. Allgemein werden diese Bereiche als „lipid rafts“ bezeichnet. Sie besitzen auf Grund des hohen Anteils an Cholesterol eine eng gepackte und sehr geordnete Struktur, ohne aber die notwendige Fluidität zu verlieren [Silvius 2003]. Wie schon beim Cholesterol erwähnt, werden diese Phasen als „liquid ordered“ bezeichnet, im Gegensatz zur sonst vorliegenden „liquid disordered“ Phase. Diese in der Membran vorliegenden Mikrodomänen erweitern das klassische Fluid-Mosaik-Modell von SINGER und NO-COLSON dahingehend, dass nun Proteine und auch Lipiddomänen wie die „lipid rafts“ in der Lipiddoppelschicht diffundieren.

Die Funktionen von „lipid rafts“ sind umstritten, weit verbreitet ist jedoch die Theorie, dass sie selektiv Proteine aufnehmen können und somit die Konzentration eines bestimmten Proteins an einer bestimmten Stelle der Membran lokal erhöhen [Munro 2003]. Dies ist besonders wichtig im Falle der Signaltransduktion, bei der Rezeptor und Ligand in einer bestimmten Mikroumgebung miteinander reagieren können, ohne durch andere Enzyme beeinflusst zu werden. Bisher konnten „lipid rafts“ in einer Vielzahl von Signalprozessen identifiziert werden, z.B. auch im Ras-Signalweg [Roy 1999, Magee 1999, Hancock 2003]. Zur Klärung der Frage, ob sich bestimmte Proteine in den speziellen Mikrodomänen aufhalten, werden Membranen mit Detergenzien wie Triton X-100 oder CHAPS bei niedrigen Temperaturen solubilisiert und die löslichen Lipide und Proteine von den Unlöslichen getrennt. Nach der anschließenden Entfernung von Cholesterol durch Cyclodextrin werden meist auch die raft-assoziierten Proteine löslich und können dann durch die üblichen biochemischen Methoden analysiert und charakterisiert werden. Ein wichtiger Begriff im Zusammenhang mit den „lipid rafts“ sind die Caveolae. Dabei handelt es sich um Einbuchtungen in der Membran, die durch die Polymerisation eines integralen palmitoylierten Membranproteins namens Caveolin gebildet werden. Vermutlich dienen sie zur Lagerung von raft-Proteinen und als Reservoir für die Lipidkomplexe. Ein physiologisches Beispiel ist das Enzym eNOS, das nach der Aktivierung in die Caveolae bewegt wird. Dort wird die Aktivität wieder herunterreguliert [Sowa 2001].

## 3 Methodik

### 3.1 Absorptionsspektroskopie

Die UV/Vis-Absorptionsspektroskopie gehört heute zu den wichtigsten Routineanalysemethoden in biologischen und biochemischen Laboratorien zur Bestimmung der Konzentration von Biomolekülen. Der Zusammenhang zwischen der Extinktion  $E$  und der Konzentration  $c$  der Probenlösung wird durch das LAMBERT-BEER'sche Gesetz beschrieben:

$$E = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon c d \quad (3.1)$$

$I_0$  und  $I$  sind die Intensitäten der Strahlung vor und nach ihrem Durchtritt durch die Probe der Dicke  $d$ ,  $\epsilon$  ist der molare dekadische Extinktionskoeffizient.

Durch die Verwendung ultravioletter (UV) und kurzwelliger sichtbarer (Vis) Strahlung werden einzelne Valenzelektronen bestimmter Molekülgruppen, den Chromophoren, angeregt. Dabei sind am häufigsten die Elektronenübergänge vom energetisch höchstliegenden besetzten bindenden oder nichtbindenden Molekülorbital,  $\pi$  oder  $n$ , in das energetisch niedrigste antibindende Molekülorbital  $\pi^*$ .

Viele Biomoleküle besitzen Chromophore mit leicht anregbaren Elektronen und können daher durch die UV/Vis-Absorptionsspektroskopie leicht identifiziert werden. Dazu gehören z.B. die aromatischen Aminosäuren (Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan), Carotin, Cytochrom  $c$  und Chlorophyll.

Das Nicotinamadenindinucleotid ( $\text{NAD}^+$ ) ist der wichtigste Elektronenakzeptor bei der Oxidation von Nahrungsstoffen wie Glucose und Fettsäuren. In aeroben Organismen dient  $\text{O}_2$  als letzter Elektronenakzeptor; jedoch werden die Elektronen nicht direkt auf  $\text{O}_2$  übertragen, sondern über spezielle Elektronen-Carrier wie das  $\text{NAD}^+$  in der Atmungskette. Die reduzierten Formen dieser Überträgermoleküle übertragen dann ihre Elektronen, die ein hohes Potential besitzen, über eine Elektronentransportkette auf  $\text{O}_2$ . Bei der Oxidation des Substrats nimmt der Nicotinamidring des  $\text{NAD}^+$  ein Wasserstoffion und 2 Elektronen auf; die reduzierte Form dieses Carriers wird als  $\text{NADH}$  bezeichnet.

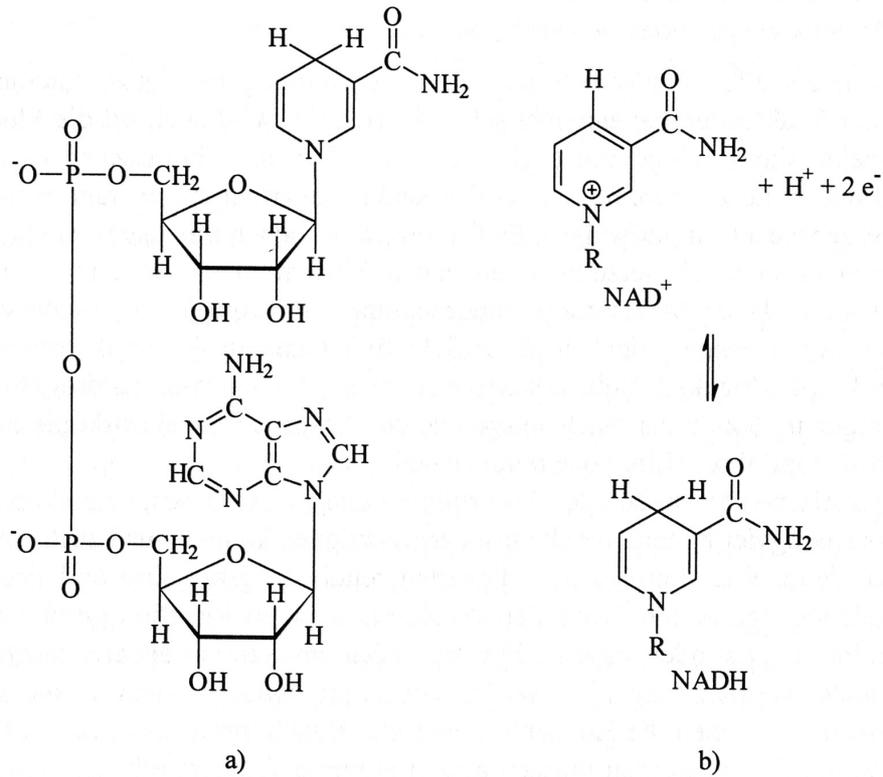


Abbildung 3.1 a) Struktur von NADH; b) Reaktionsablauf bei der Oxidation von NADH zu NAD<sup>+</sup>.

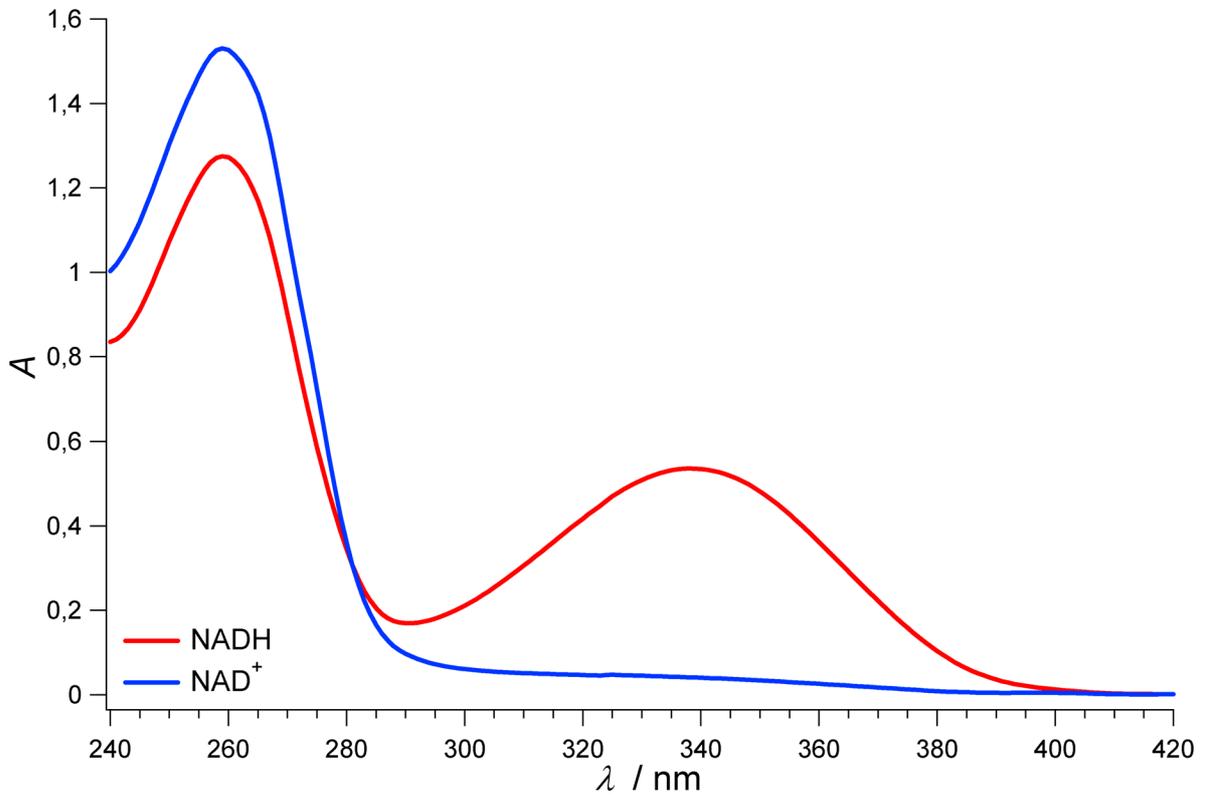


Abbildung 3.2 Absorptionsspektren von NADH und NAD<sup>+</sup>.

---

Bei einer Reihe von Enzymreaktionen wird NADH in  $\text{NAD}^+$  umgewandelt. Die Absorptionsspektren dieser beiden Verbindungen sind in Abb. 3.2 dargestellt. Da die oxidierte Form im Bereich von 340 nm nicht absorbiert, kann die Abnahme der Konzentration an NADH bei dieser Wellenlänge sehr leicht verfolgt werden.

Reaktionen von Enzymen, die NADH als Co-Substrat benötigen, können mit dieser Methode verfolgt werden. Ein Beispiel hierfür ist die von der Lactat-Dehydrogenase katalysierte Reaktion von Pyruvat zu Lactat.

## 3.2 Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenzspektroskopie ist eine von den wenigen experimentellen Methoden, mit denen sowohl die Dynamik als auch die Struktur komplexer Moleküle untersucht werden können. Auf Grund ihrer sehr hohen Empfindlichkeit ermöglicht sie zudem die zerstörungsfreie Untersuchung auch geringster Probenmengen mit einer Zeitauflösung bis in den Nanosekundenbereich hinein. Im Folgenden soll nur auf die für diese Arbeit relevanten Aspekte der Fluoreszenzspektroskopie eingegangen werden, für weitergehende Informationen siehe z.B. [Lakowicz 1999].

### 3.2.1 Elektronische Anregung und Relaxation

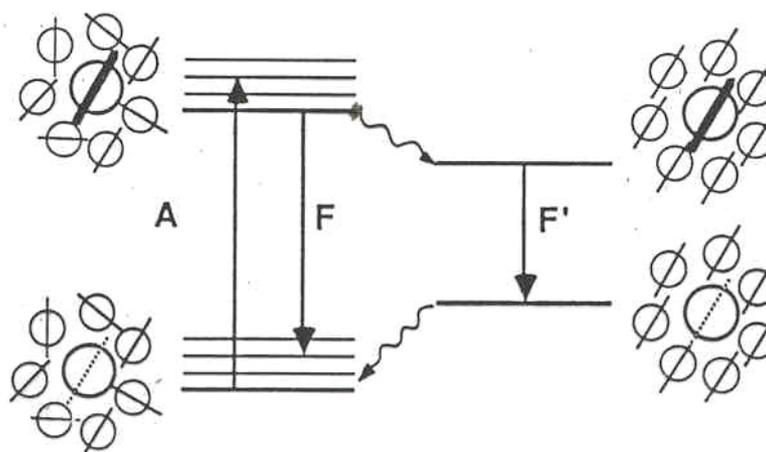
Fluoreszenz und Phosphoreszenz sind Lumineszenzprozesse, d.h. nach der Anregung eines Moleküls in einen elektronisch angeregten Zustand erfolgt die Relaxation in den elektronischen Grundzustand durch die Emission eines Photons. Während jedoch bei der Fluoreszenz die Relaxation innerhalb von Nano- bis Mikrosekunden erfolgt, kann bei der Phosphoreszenz die Emission der Strahlung bis in den Bereich von Minuten andauern. Ursache dafür ist ein quantenmechanisch verbotener Singulett/Triplett-Übergang des Systems, wodurch es nur langsam zu einer Strahlungsabgabe kommt.

Jedes Molekül besitzt eine Vielzahl von diskreten Energiezuständen, die weiter in Schwingungs- und Rotationsniveaus unterteilt sind. Bei Raumtemperatur liegen die meisten Moleküle gemäß der BOLTZMANN-Verteilung im niedrigsten Schwingungsniveau des elektronischen Grundzustands ( $S_0, v=0$ ) vor. Der Übergang vom Grundzustand in den ersten elektronisch angeregten Zustand ( $S_1$ ) erfolgt durch Absorption (A) elektromagnetischer Strahlung einer bestimmten Wellenlänge. Dieser Übergang vollzieht sich nach dem FRANCK-CONDON-Prinzip im Femtosekundenbereich als vertikaler Übergang viel schneller als eine Änderung der Kernabstände, wodurch der Übergang in höhere Schwingungsniveaus des elektronisch angeregten Zustandes wahrscheinlicher wird als in dessen unterstes Schwingungsniveau. Die Abgabe der Überschussenergie kann dabei auf sehr unterschiedlichen Wegen erfolgen. Abbildung 3.3 zeigt ein stark vereinfachtes JABLONSKI-Diagramm der Energiezustände eines Fluorophors mit den wichtigsten Relaxationsprozessen.

Innerhalb der Verweilzeit im angeregten Zustand gelangt das Molekül in den untersten Schwingungszustand des ersten elektronisch angeregten Zustandes ( $S_1, v=0$ ). Dieser im Bereich von Pico- bis Nanosekunden ablaufende Prozess, der als innere Umwandlung (*internal conversion, IC*) bezeichnet wird, erfolgt durch Stöße mit den umgebenden Lösungsmittelmolekülen [Lakowicz 1999].



Da die Fluoreszenzemission durch den Übergang vom niedrigsten Schwingungsniveau des elektronisch angeregten Zustandes in den elektronischen Grundzustand hervorgerufen wird, ist die äußere Form des Emissionsspektrums weitgehend unabhängig von der Wellenlänge der anregenden Strahlung. Das Absorptionsspektrum weist eine Schwingungsfinestruktur auf, die für die Besetzungswahrscheinlichkeit des angeregten Zustandes charakteristisch ist. Im Gegensatz dazu enthält ein Emissionsspektrum Schwingungsfinestrukturen, welche die unterschiedliche Besetzung der Schwingungsniveaus des elektronischen Grundzustandes des Fluorophors wiedergeben. Besitzen Grund- und angeregter Zustand dieselbe Schwingungsfinestruktur, so sind Emissions- und Absorptionsspektrum ein Spiegelbild voneinander. Der Übergang vom untersten Schwingungsniveau des Grundzustandes ( $v = 0$ ) zum untersten Schwingungsniveau des ersten angeregten Zustandes ( $v' = 0$ ) wird als 0-0-Übergang bezeichnet und besitzt für die Absorption und Emission dieselbe Energie. Eine Überlappung beider Spektren findet bei der dem 0-0-Übergang entsprechenden Wellenlänge statt. In der Regel sind die Schwingungsübergänge in Lösung nicht aufgelöst, und die Überlappung von Absorptions- und Fluoreszenzbande ist relativ groß. Dafür verantwortlich sind im Wesentlichen Lösungsmittelinhomogenitäten und Wechselwirkungen zwischen den Fluorophoren sowie unterschiedliche Dipolmomente im Grund- und angeregten Zustand. Dies hat zur Folge, dass die Lage der Energieniveaus durch das umgebende Lösungsmittel unterschiedlich stark beeinflusst wird. Die Abbildung 3.4 verdeutlicht den Prozess der Lösungsmittelrelaxation eines Fluorophors mit einem schwachen Dipolmoment im Grundzustand und einem großen Dipolmoment im angeregten Zustand.



**Abbildung 3.4** Erklärung der Rotverschiebung der Emission durch die Lösungsmittelrelaxation.

Durch die Absorption von Strahlung (in  $10^{-15}$  s) ändert sich die Stärke des elektrischen Dipolmomentes des Fluorophors und die Lösungsmittelmoleküle ordnen sich nun antiparallel zum Dipolmoment des Fluorophors an. Dies nimmt etwa  $10^{-10}$  s in Anspruch und führt zur Stabilisie-

rung des  $S_1$ -Zustandes und somit zur energetischen Absenkung. Nach der Emission des Photons besitzt der Fluorophor wieder sein ursprüngliches Dipolmoment, aber die Orientierung der Lösungsmittelmoleküle unterscheidet sich von der Anordnung im Grundzustand. Als Ergebnis bleibt eine Rotverschiebung der Fluoreszenz  $F'$  auf Grund der Wechselwirkung mit den Lösungsmittelmolekülen. Je größer die Polarität des Lösungsmittels ist, desto größer ist im Allgemeinen die Rotverschiebung. Dies gilt jedoch nur, wenn das Dipolmoment im elektronisch angeregten Zustand größer ist als das im Grundzustand. Weiterhin ist hier angenommen, dass die Umorientierungszeit  $\tau_R$  sehr viel kleiner ist als die Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_F$ . Diese Bedingung ist wegen  $\tau_R \sim 10^{-12} - 10^{-10}$  s im Allgemeinen erfüllt. Für tiefe Temperaturen kann jedoch  $\tau_R \sim \tau_F$  werden.

Die messbare Fluoreszenzintensität hängt davon ab, wie groß der Anteil der strahlungslosen Deaktivierungsprozesse ist. Die Aufzeichnung der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Emissionswellenlänge bei gegebener fester Anregungswellenlänge wird als Emissionsspektrum bezeichnet. Verändert man dagegen die Wellenlänge der anregenden Strahlung und trägt die Fluoreszenzintensität der Probe bei einer konstanten Emissionswellenlänge gegen die jeweilige Anregungswellenlänge auf, so erhält man ein so genanntes Anregungsspektrum.

### 3.2.3 Energietransfer nach FÖRSTER

Die Anregungsenergie eines Fluorophors kann auf Moleküle übertragen werden, die direkt in Kontakt mit dem Fluorophor kommen, wie es bei der statischen und dynamischen Fluoreszenzlöschung durch Quenchemoleküle der Fall ist. Beim Energietransfer nach FÖRSTER geschieht diese Übertragung auf Moleküle in der Nähe durch schwache Kopplung von Donor- und Akzeptormolekül bis zu einem Abstand von 8 nm. Voraussetzung für diesen Prozess ist eine Überlappung des Absorptionsspektrums des Akzeptors mit dem Emissionsspektrum des Fluorophors oder Donors. Die Geschwindigkeitskonstante des Energietransfers  $k_{\text{trans}}$  ist dem Quadrat der Wechselwirkungsenergie  $E_{\text{DD}}$  zwischen den beiden Übergangsdipolmomenten proportional:

$$k_{\text{trans}} \propto E_{\text{DD}}^2 = \frac{1}{n_L^4 R^6} \mu_D^2 \mu_A^2 K^2 \quad (3.2)$$

Hierbei sind  $n_L$  der Brechungsindex der Lösung,  $R$  der Abstand zwischen den Molekülen und  $\mu_A$  und  $\mu_D$  die Übergangsdipolmomente von Akzeptor und Donor. Zur Vereinfachung wurden alle Terme, die die Orientierung der Vektoren der Dipolmomente und des Abstandes enthalten, zur Größe  $K$  zusammengefasst. Für eine statistische Orientierung von  $\vec{\mu}_A$  und  $\vec{\mu}_D$  ist  $K^2 = 2/3$ .

Die Quadrate der Übergangsdipolmomente werden durch die Oszillatorenstärken  $f$  der Übergänge ersetzt. Diese sind ebenfalls ein Maß für die Intensität der Übergänge und daher den entsprechenden Geschwindigkeitskonstanten  $k$  proportional:

$$f_D \propto k_{F,D} = \frac{Q_{F,D}}{\tau_D} \quad (3.3)$$

$Q_{F,D}$  ist die Fluoreszenzquantenausbeute des Donors,  $\tau_D$  die Lebensdauer des Donors ohne Akzeptormoleküle. Da  $k_{\text{trans}}$  auch proportional dem spektralen Überlapp  $J$  ist, erhält man somit für die Geschwindigkeitskonstante:

$$k_{\text{trans}} = \text{konst.} \cdot \frac{K^2 J Q_{F,D}}{n_L^4 R^6 \tau_D} \quad (3.4)$$

Die konstanten Größen in Gleichung 3.4 werden nun zum sog. FÖRSTER-Radius  $R_0$  zusammengefasst:

$$k_{\text{trans}} = \frac{1}{\tau_D} \left( \frac{R_0}{R} \right)^6 \quad (3.5)$$

Damit fällt der Energietransfer  $E_{\text{trans}}$  zwischen Akzeptor und Donor mit der sechsten Potenz des Abstandes  $R$  ab. Für biologische Systeme liegt  $R_0$  in der Regel zwischen 2 und 6 nm, wobei der FÖRSTER-Radius auf Grund der ungenauen Kenntnis des sterischen Faktors  $K$  meist nicht genau bestimmt werden kann. Die Messung des Energietransfers wird dennoch häufig durchgeführt, um die Frage qualitativ zu beantworten, ob die am Energietransfer beteiligten Gruppen eng benachbart sind oder nicht. Dazu werden die Intensitäten der Fluoreszenz in An- und Abwesenheit des Akzeptors gemessen:

$$E_{\text{trans}} = \frac{I_{F,D} - I_{F,D+A}}{I_{F,D}} = \frac{1}{1 + (R/R_0)^6} \quad (3.6)$$

Bei Kenntnis von  $R_0$  lässt sich somit der mittlere Abstand  $R$  der Moleküle D und A bestimmen.

### 3.3 Fluoreszenzmikroskopie

Die Methode der Fluoreszenzmikroskopie gehört heute zu den Routinemethoden in biologischen und biochemischen Laboratorien. Zu den Hauptanwendungsgebieten gehören die Immunfluoreszenz bzw. die medizinische Diagnostik, in der z.B. die Bildung eines Antigen-Antikörper-Komplexes durch Fluoreszenzmarkierung verfolgt werden kann. Durch die spezifische Anfärbung bestimmter Zellbestandteile, wie z.B. dem Cytoskelett oder der Kernmembran, können Strukturen in lebenden Zellen sehr detailliert dargestellt sowie Transportvorgänge innerhalb der Zelle mit einer Ortsauflösung von ungefähr einem Mikrometer verfolgt werden. Besonders nach der Entdeckung des „Green Fluorescent Proteins“ (GFP) war es möglich, durch die Methoden der Molekularbiologie die genetische Information des GFP an bestimmte Proteine zu „fusionieren“ und somit z.B. die Expression dieses Proteins durch die nun auftretende Fluoreszenz in der Zelle beobachten zu können [Tsien 1998]. Der Weitertransport innerhalb der Zelle war nun mit relativ einfachen Mitteln im Fluoreszenzmikroskop beobachtbar, auch die Lokalisierung von Interaktionspartnern des Proteins ist möglich. Neben den Routineanwendungen hat sich die Fluoreszenzmikroskopie aber auch als Methode zur Charakterisierung von GUV etabliert, hier besonders zur Beobachtung von Phasenkoexistenzen in Modellbiomembranen sowie zur Lokalisierung von Peptiden bzw. Proteinen in bestimmten Lipidphasen. Auf die hierzu notwendigen technischen Änderungen im Vergleich zur klassischen Fluoreszenzmikroskopie soll im Folgenden näher eingegangen werden.

#### 3.3.1 Zwei-Photonenanregung

Die Zwei-Photonenanregung ist ein nichtlinearer Prozess bei dem ein Fluorophor zwei Photonen simultan absorbiert. Jedes Photon besitzt dabei die Hälfte der benötigten Energie. Die hohe Photonendichte für die Zwei-Photonenabsorption wird dabei erzielt durch die Verwendung eines starken Laserstrahls, der durch ein Objektiv mit einer hohen numerischen Apertur N.A. auf einen Punkt fokussiert wird. Die numerische Apertur N.A. ist ein Zahlenwert für das Auflösungsvermögen eines Objektivs; sie ist eine Masszahl für die vom Mikroskopobjektiv aufgenommene Lichtmenge und definiert als:

$$\text{N.A.} = n \cdot \sin \alpha \quad (3.7)$$

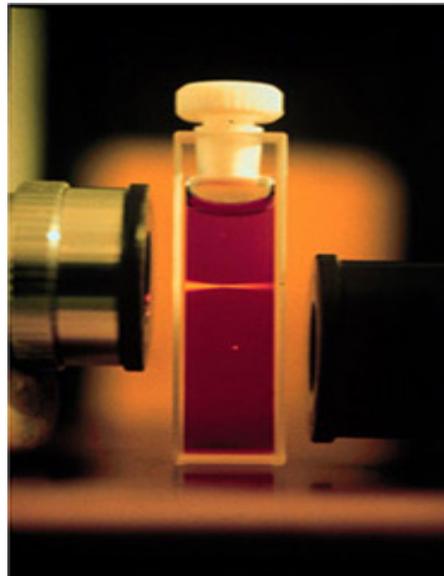
$n$  ist der Brechungsindex des Mediums,  $\alpha$  der halbe Öffnungswinkel des Objektivs.

Auf Grund der zu geringen Photonendichte kommt es in den Bereichen unterhalb und oberhalb der Fokusebene nicht zur Zwei-Photonenabsorption. Die Anzahl Photonenpaare  $n_a$ , die von einem Fluorophor pro Laserpuls absorbiert werden, wird durch Gleichung 3.8 beschrieben:

$$n_a = \frac{\delta \bar{P}^2}{F_p^2 \tau_p} \left( \frac{\pi \text{N.A.}^2}{hc\lambda} \right)^2 \quad (3.8)$$

Die Effizienz der Zwei-Photonenabsorption hängt demnach linear vom Zwei-Photonenquerschnitt  $\delta$  und quadratisch von der mittleren Leistung  $\bar{P}$  des Lasers ab. Die Wahrscheinlichkeit der Absorption ist weiterhin proportional zur vierten Potenz der numerischen Apertur N.A. des Objektivs, umgekehrt proportional zur Pulsweite  $\tau_p$  und umgekehrt proportional zum Quadrat der Wiederholungsfrequenz  $F_p$  des Lasers.  $\lambda$  ist die Wellenlänge des Lasers,  $h$  das Plancksche Wirkungsquantum und  $c$  die Lichtgeschwindigkeit.

Abbildung 3.5 zeigt deutlich den Unterschied zwischen der Ein-Photonanregung und der Anregung durch zwei Photonen einer Rhodaminlösung. Bei der Ein-Photonanregung ist die Fluoreszenz des Rhodamins in der gesamten Einstrahlebene sichtbar, wo hingegen bei der Zwei-Photonenanregung nur ein kleiner Punkt in der Mitte der Küvette Fluoreszenz aufweist. Dieser Auswahleffekt wird sonst in der konfokalen Mikroskopie nur durch die Verwendung eines Pinholes erreicht. Ein weiterer Vorteil ist das geringe Maß an Photobleaching ober- und unterhalb der Fokusebene.

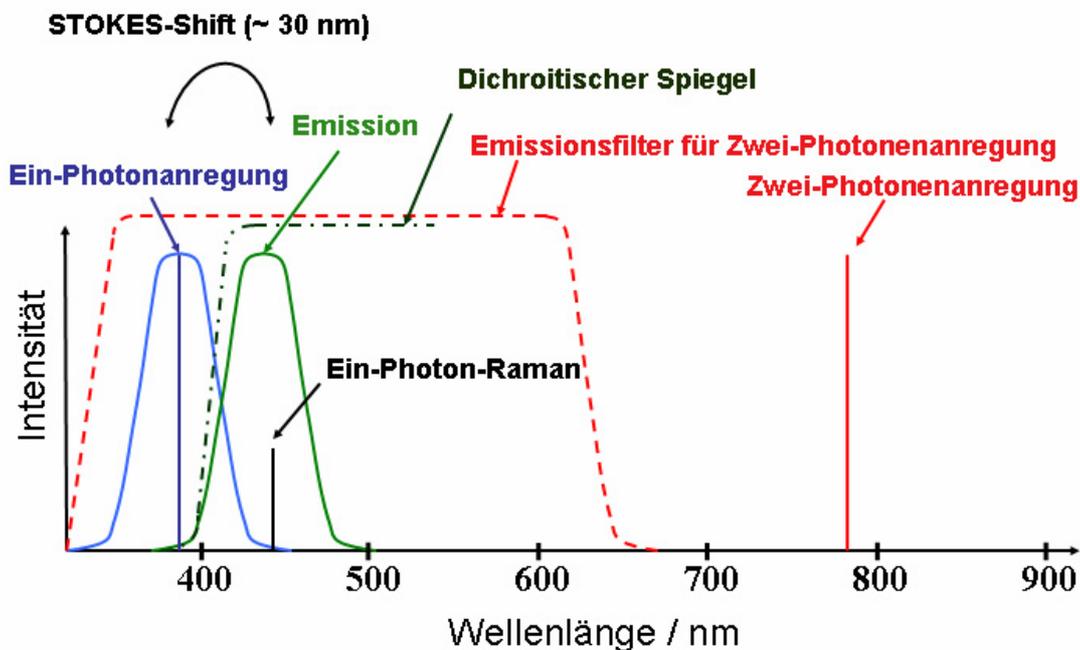


**Abbildung 3.5** Emission einer Rhodamin-Lösung durch Ein-Photon- (oben) und Zwei-Photonenanregung (unten) (Brad Amos MRC, Cambridge, UK).

Ein wichtiger Aspekt bei der Verwendung der Fluoreszenzmikroskopie ist die Wahl des passenden Filtersatzes. Das größte Problem ist dabei die Trennung von Anregung und Emission, die

häufig nur durch einen STOKES-Shift von  $\sim 30$  nm voneinander getrennt sind. Für unterschiedliche Fluorophore müssen daher auch fast immer andere dichroitische Spiegel für verwendet werden, um eine optimale Trennung und somit ein gutes Fluoreszenzsignal zu erreichen. Zusätzlich wird die Emissionsbande auch noch von der Raman-Bande überlagert. Dichroitische Spiegel sind in diesem Fall undurchlässig für Strahlung mit kleiner Wellenlänge (Anregungsstrahlung), aber durchlässig für Strahlung mit größerer Wellenlänge (Emissionsstrahlung).

In Abbildung 3.6 werden die Vorteile der Zwei-Photonenanregung gegenüber der klassischen Ein-Photonenanregung deutlich. Durch die Verschiebung der Anregung zu größeren Wellenlängen wird mit einem einfachen Breitbandfilter die Emission von der Anregung getrennt und kann somit wesentlich einfacher detektiert werden.



**Abbildung 3.6** Lage der Anregungs- und Emissionsbande bei der Ein-Photonenanregung im Vergleich zur Zwei-Photonenanregung sowie verwendete Filter.

Auch der Einfluss der Raman-Bande entfällt. Mit einem Setup können nun verschiedene Fluorophore detektiert werden, denn die einzige variable Größe ist die Anregungswellenlänge des Lasers. Da die Zwei-Photonenanregungsspektren vieler Fluorophore sehr breite Banden zwischen 750 nm und 900 nm aufweisen, kann in den meisten Fällen sogar mit nur einer Anregungswellenlänge des Lasers von z.B. 780 nm gearbeitet werden. 780 nm als Anregungswellenlänge ist ideal für die Anregung von LAURDAN und sehr gut für das *N*-Rh-DPPE.

---

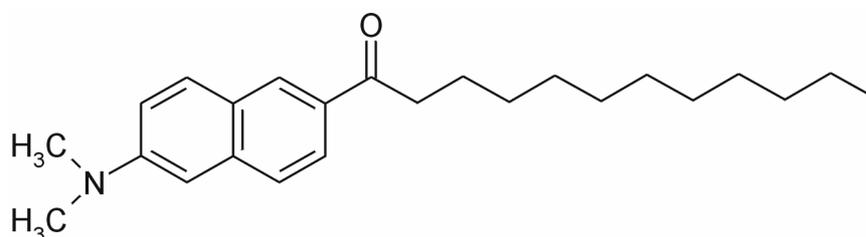
### 3.3.2 XY-Scanning

Ein weiterer wesentlicher Aspekt der modernen Zwei-Photonenanregungs-Fluoreszenzmikroskopie ist die Möglichkeit, Ebenen zu scannen und so Punkt für Punkt ein Bild zusammensetzen zu können. Hochempfindliche Photomultiplier als Detektoren ermöglichen die Verwendung geringer Fluorophorkonzentrationen; zusätzlich kann für jeden Punkt des Scans die Emission in mehreren Kanälen detektiert werden. Dies ist sehr wichtig bei der Arbeit mit mehreren Fluorophoren gleichzeitig oder der Verwendung von LAURDAN, denn mit den Informationen aus den einzelnen Kanälen kann ein GP-Image oder eine andere Korrelation zwischen den Informationen in verschiedenen Kanälen berechnet werden. Damit ist es z.B. möglich, die Frage nach der Löslichkeit von Lipopeptiden in bestimmten Lipidumgebungen zu beantworten. Ebenso kann der Einfluss eines Peptids auf das Phasenverhalten der Lipidmatrix quantitativ durch die Bestimmung des GP-Images untersucht werden.

## 3.4 Fluorophore

### 3.4.1 LAURDAN

Der Fluorophor LAURDAN gehört zu einer Gruppe von Fluorophoren, deren einfachster Vertreter, das PRODAN<sup>1</sup>, erstmalig von WEBER und FARRIS 1979 synthetisiert wurde [WEBER 1979]. Ziel war die Darstellung eines Fluorophors, der auf Grund eines großen Dipolmoments im elektronisch angeregten Zustand eine empfindliche Sonde für die Polarität der Fluorophorumgebung darstellt. Weitere Verbindungen mit sehr ähnlicher Struktur neben LAURDAN sind LAURISAN, LAURNA und LAURMEN<sup>2</sup>. Die Struktur von LAURDAN ist in Abbildung 3.7 dargestellt.



**Abbildung 3.7:** Chemische Struktur von LAURDAN (6-dodecanoyl-2-dimethylamino-naphthalen).

Charakteristisch für diese Verbindungen ist ein stark zunehmender STOKES-Shift der Fluoreszenzmission mit steigender Polarität des Lösungsmittels auf Grund der zunehmenden dipolaren Relaxation. In Modellbiomembranen zeigen die Fluoreszenzspektren von LAURDAN eine charakteristische Abhängigkeit vom Phasenzustand der Lipide. Der extrinsische Fluorophor ist auf Grund seiner langen hydrophoben Kette in der Lage, sich zwischen die Lipidmoleküle einer Membran einzulagern (s. Abb. 3.8). Wichtig ist hierbei die Tatsache, dass die Löslichkeit von LAURDAN in den beiden Lipidphasen identisch ist und es somit zu keinem bevorzugten Einbau in eine Lipidphase kommt. Auf der Höhe des Glycerolrückgrates ist die für die Fluoreszenz verantwortliche Dimethylaminonaphthalen-Gruppierung lokalisiert und ist eine Sonde für deren Mikroumgebung.

<sup>1</sup> PRODAN: 6-propionyl-2-N,N-dimethylaminonaphthalene

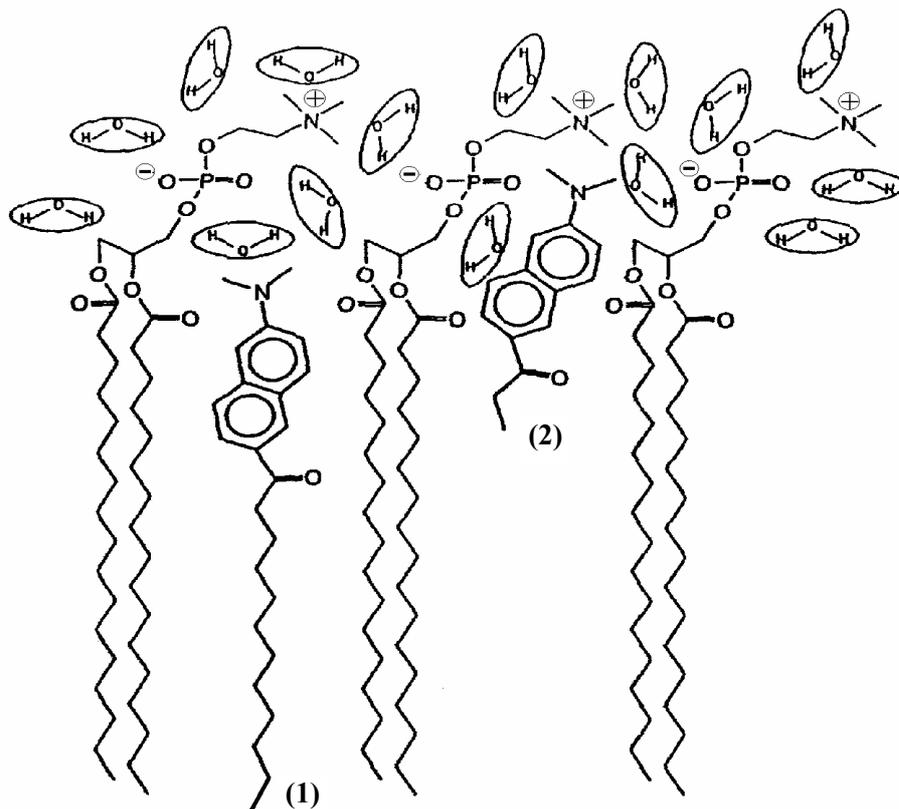
<sup>2</sup> LAURISAN: 6-diisopropylamino-6-lauroylnaphthalene

LAURNA: 2-hydroxy-6-lauroylnaphthalene

LAURMEN: 2-methoxy-6-lauroylnaphthalene

Beim Übergang von der Gelphase in die flüssig-kristalline Phase verschiebt sich das Maximum der Emission von 440 nm zu 490 nm auf Grund der zunehmenden dipolaren Relaxation, hervorgerufen durch die zunehmende Polarität in der direkten Umgebung des Fluorophors. Im Bereich der Phasenübergänge von Einkomponentensystemen sowie in Gebieten der Phasenkoexistenz in Mehrkomponentenlipidsystemen kommt es daher zur Ausbildung einer breiten Fluoreszenzbande mit Maxima zwischen 440 nm und 490 nm.

Neben der Emission zeigt auch das Anregungsspektrum von LAURDAN charakteristische Maxima. In der Gelphase treten zwei Anregungsmaxima auf, eines bei 370 nm und eines bei 390 nm. Letzteres wird einem relaxierten elektronischen Grundzustand mit bereits energetisch günstig orientierten Wasserdipolen zugeordnet. Beim Übergang in die  $L_\alpha$ -Phase tritt eine Blauverschiebung des Spektrums auf und es wird nur noch ein Maximum bei 355 nm beobachtet.



**Abbildung 3.8:** Schematische Darstellung des Einbaus von LAURDAN (1) und PRODAN (2) in eine Phospholipiddoppelschicht.

### 3.4.1.1 Das Konzept der verallgemeinerten Polarisation

Zur quantitativen Beschreibung der Phasenkoexistenz und der Phasenübergänge von Lipidmembranen wurde das Konzept der „verallgemeinerten Polarisation“ (*Generalized Polarisation, GP*) entwickelt:

$$GP = \frac{I_B - I_R}{I_B + I_R} \quad (3.9)$$

$I_B$  und  $I_R$  sind die Intensitäten der Fluoreszenzemission im blauen und im roten Bereich des Spektrums [Parasassi 1990, 1991]. Weit verbreitet ist die Verwendung des Anregungs-GP-Wertes  $GP_{ex}$ . Dabei werden gezielt LAURDAN-Moleküle in der Gelphase durch die Verwendung einer Anregungswellenlänge von 390 nm angeregt und die Intensitäten der Fluoreszenz bei 440 nm und 490 nm gemessen. Der  $GP_{ex}$ -Wert wird dann gemäß Gleichung 3.10 berechnet:

$$GP_{ex} = \frac{I_{440\text{ nm}} - I_{490\text{ nm}}}{I_{440\text{ nm}} + I_{490\text{ nm}}} \quad (3.10)$$

In Analogie zur klassischen Fluoreszenzpolarisation ist der  $GP_{ex}$ -Wert in diesem Fall ein Maß für die Aufrechterhaltung der anfänglichen Photoselektion. Der Maximalwert von +1 würde ausschließlich der Emission von Molekülen in der Gelphase entsprechen, der Wert von -1 der Emission von Molekülen in der fluiden Phase. Die experimentell bestimmten Werte für die reinen Lipidphasen liegen bei  $\sim 0,6$  für die Gelphase und bei  $\sim -0,3$  für die fluide Phase. In den Bereichen der Phasenübergänge und der Phasenkoexistenz werden intermediäre  $GP_{ex}$ -Werte gemessen; auf Grund der Additivität ist somit eine Quantifizierung der vorliegenden Phasen möglich. Im weiteren Text wird für den Terminus Anregungs-GP-Wert nur noch GP verwendet, da in den Experimenten ausschließlich der GP-Wert nach Gleichung 3.9 verwendet wird.

Das Konzept der verallgemeinerten Polarisation kann sehr universell eingesetzt werden, wichtige Gründe dafür sind:

- 1) Der GP-Wert ist nur abhängig vom Phasenzustand der Lipide, nicht von der Lipidart oder Ladung, d.h. auf verschiedenste Systeme anwendbar.
- 2) Es ist keine Kalibrierung der Daten erforderlich.
- 3) Eine statische Fluoreszenzmessung ist ausreichend, um Informationen über Polarität und Dynamik in der Fluorophorumgebung zu erhalten.

### 3.4.1.2 Anwendungsgebiete

Die Anwendungsgebiete von LAURDAN sind aus den obigen Gründen sehr vielfältig, lassen sich jedoch grob in zwei Gebiete unterteilen:

- 1) Experimente zur Untersuchung des Einflusses von verschiedenen Zusätzen auf unterschiedliche Modellbiomembransysteme.
- 2) Experimente zur Charakterisierung von Membranen in lebenden Zellen.

Beispiele für Untersuchungen aus dem ersten Bereich sind der Einfluss von Cholesterol [Parassassi 1992, 1994, 1994a, 1995, Levi 1993, Levi 1997], Alkoholen [Campos 1995, Zeng 1995], Thionin [Wilson 1997] und Ionen [Zubiri 1999] auf Modellmembranen.

Untersuchungen an Membranen in lebenden Zellen wurden z.B. an Erythrozyten (Rote Blutkörperchen) [Alleva 1995, Gabbianelli 1996], an Viren [Pozzi 1996, Lisi 1993], Spermien [Palleschi 1996], Leberzellen [Garda 1997] und an Neuronen [Tapia 1998] durchgeführt. Ansätze für praktische Anwendungen aus diesem Bereich sind die optische Temperaturmessung von Zellen [Chapman 1995] sowie die Qualitätsüberprüfung von Blutkonserven [Alleva 1995].

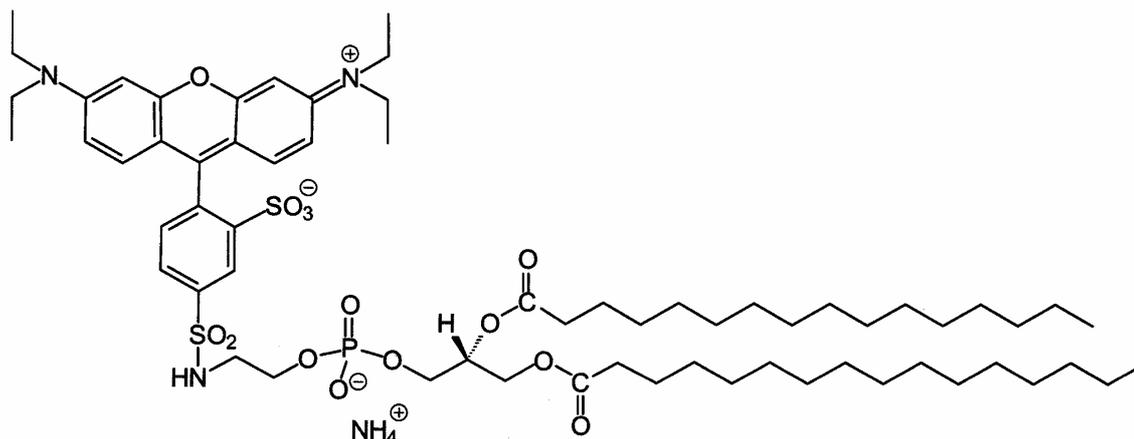
Eine sehr interessante aktuelle Verwendung von LAURDAN ist der Einsatz als Sonde für Informationen über den Phasenzustand von Membranen in Mikroorganismen. Mit Hilfe der Messung der GP-Werte konnte der Einfluss von Druck auf die Aktivität von HorA, einem ATP-bindenden Transporterprotein, in Zusammenhang mit der Zusammensetzung der Membran des *Lactobacillus plantarum* aufgezeigt werden [Ulmer 2002].

Eine weitere sehr aktuelle Verwendung von LAURDAN ist der Einsatz als Sonde für die Fluoreszenzmikroskopie, und da besonders für die Zwei-Photonenanregungsmikroskopie [Bagatolli 2000, 2001, 2003]. LAURDAN dient hier zur Charakterisierung des Phasenverhaltens von GUV in Hinblick auf Phasenkoexistenz und den Einfluss von Proteinen und Peptiden. Entscheidend hierbei ist die Tatsache, dass LAURDAN selbst bei hohen Konzentrationen (> 5 mol%) keinen Einfluss auf das Phasenverhalten der Lipidmembran zeigt.

### 3.4.2 N-Rh-DPPE

Der Fluorophor N-Rh-DPPE wird sehr häufig in der Fluoreszenzmikroskopie bei Experimenten an GUV verwendet. Die entscheidende Eigenschaft ist dabei die sehr viel größere Löslichkeit des Fluorophors in der fluiden Phase als in der Gelphase. Kommt es in den Experimenten zur Ausbildung einer Phasenkoexistenz von Gelphase und flüssig-kristalliner Phase, wird diese im

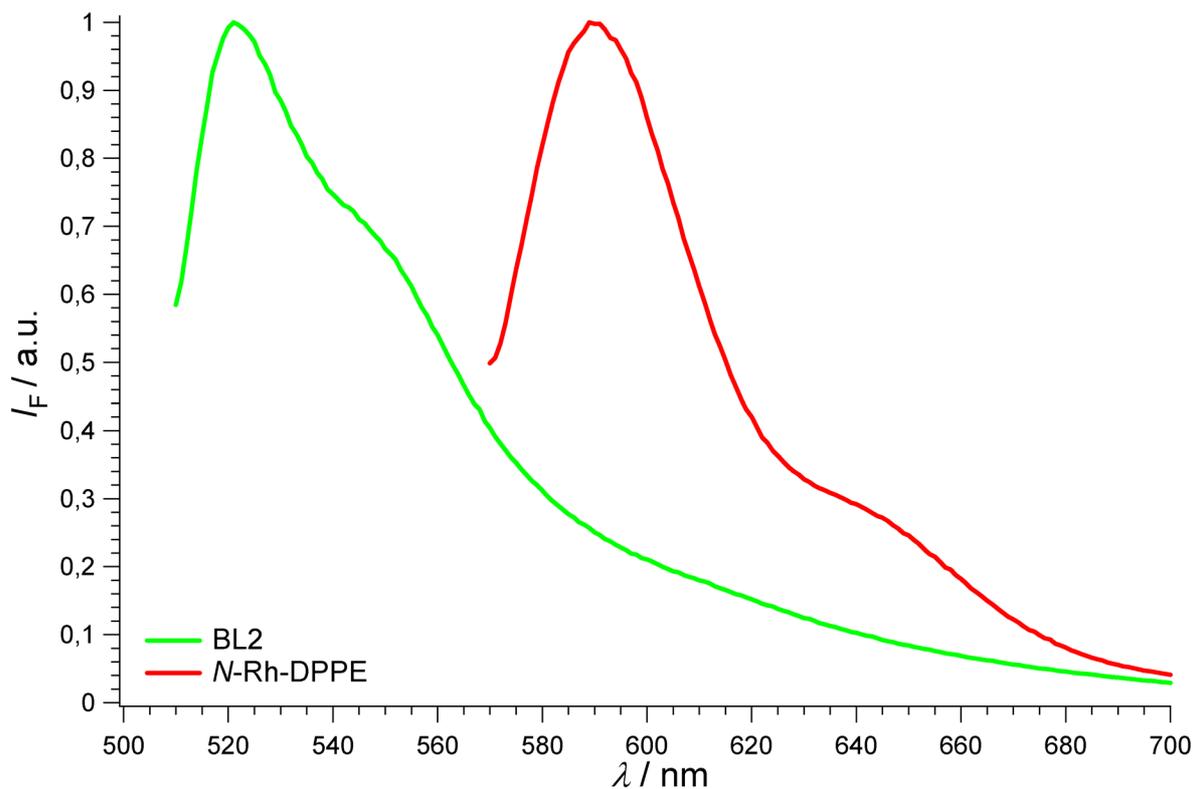
Fluoreszenzmikroskopbild durch dunkle Regionen auf der Vesikeloberfläche sichtbar. Weitere wichtige Eigenschaften sind die gute Quantenausbeute des Rhodamins und ein sehr breites Zweiphotonenanregungsspektrum. Durch diese können die Konzentration an Fluorophor sehr gering gehalten werden und es ist ein Einsatz zusammen mit weiteren Fluorophoren in Mehrkanalexperimenten möglich.



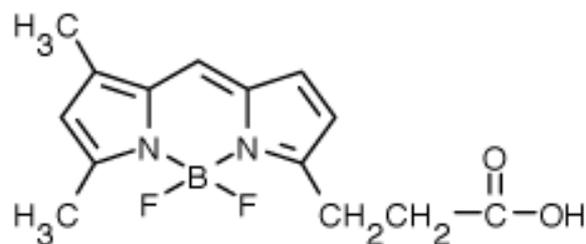
**Abbildung 3.9** Chemische Struktur von *N*-Rh-DPPE (Lissamine rhodamine B, 1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine)

### 3.4.3 BODIPY

Die einzigartigen spektralen Eigenschaften und die sehr große Photostabilität des Fluorophors BODIPY (4,4'-Difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indacen) im Vergleich zu anderen Fluorophoren sind die Gründe für die zahlreichen Anwendungsgebiete dieses Fluorophors in den verschiedensten Bereichen [Drummen 2002, Dahim 2002, Bai 1997]. Seine relativ geringe Größe erlaubt es, selbst kleinere Moleküle mit dem Fluorophor zu koppeln, ohne die Eigenschaften des Moleküls zu stark zu ändern; die hohe Quantenausbeute und die geringe Empfindlichkeit gegenüber Photobleaching erlauben den Einsatz selbst in geringsten Konzentrationen. Die große Anzahl von Derivaten mit unterschiedlichen Anregungs- und Emissionsmaxima erlaubt die Verwendung des BODIPY zusammen mit vielen anderen Fluorophoren. Die Emissionsspektren von *N*-Rh-DPPE und BODIPY-FL sind zusammen in Abbildung 3.11 dargestellt, die Abbildung 3.12 zeigt die Struktur des BODIPY-FL. FL steht hier als Abkürzung für „fluorescein-like“.

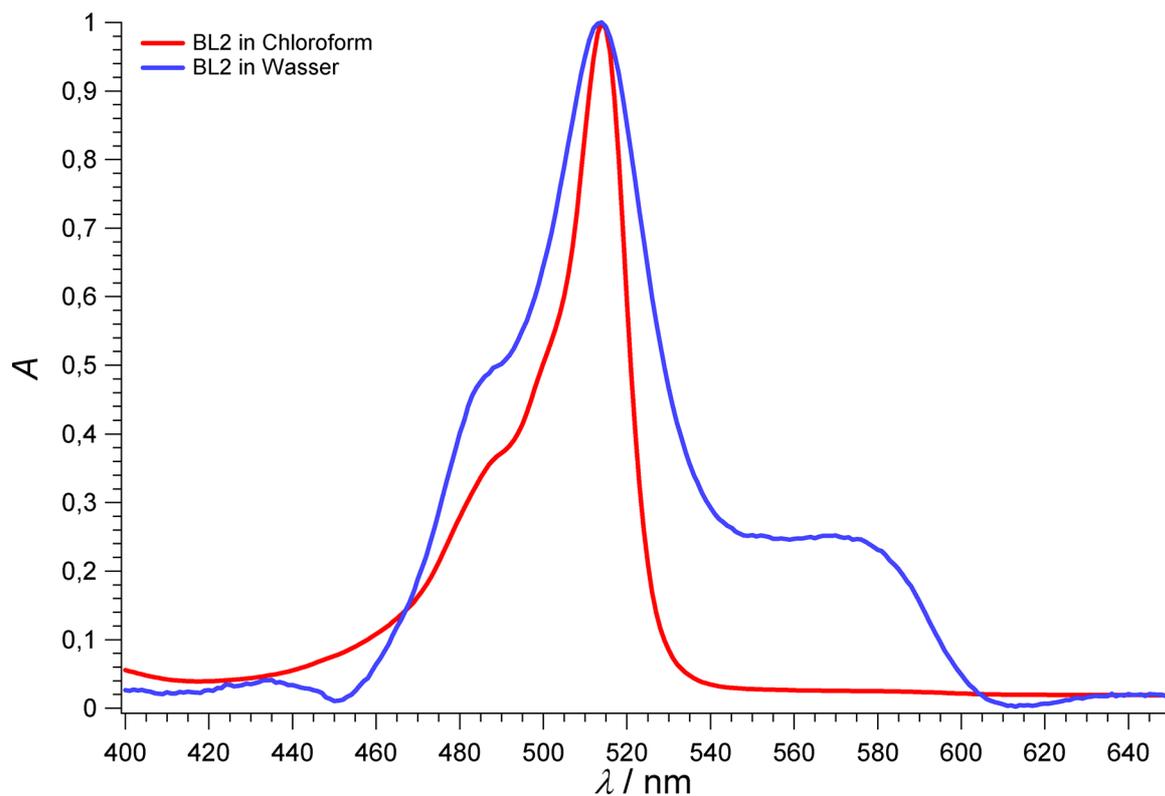


**Abbildung 3.10** Emissionsspektren des *N*-Rh-DPPE und des Peptids BL2 mit der BODIPY(FL)-Gruppe.



**Abbildung 3.11** Chemische Struktur des BODIPY-FL.

BODIPY-Moleküle im elektronischen Grundzustand können zwei verschiedene Dimere ausbilden, die als  $D_I$  und  $D_{II}$  bezeichnet werden.  $D_I$  zeichnet sich durch eine starke Absorptionsbande mit dem Maximum bei 477 nm aus, wobei aber keine Fluoreszenzemission beobachtet wird. Das Dimer  $D_{II}$  weist eine Absorptionsbande mit dem Maximum bei 577 nm auf, die Emission der Fluoreszenz zeigt eine breite Bande mit dem Maximum bei 630 nm [Bergstroem 2002].



**Abbildung 3.12** Absorptionsspektren des Peptids BL2 in Wasser und in Chloroform.

Die Abbildung 3.13 zeigt die Absorptionsspektren eines kleinen Peptids mit dem Namen BL2, das mit dem Fluorophor BODIPY-FL markiert ist, in Chloroform und in Wasser. Auf Grund der guten Löslichkeit des Peptids in Chloroform ist im Spektrum die gewöhnliche Absorptionsbande des BODIPY-FL erkennbar, das Maximum liegt bei  $\sim 515$  nm. Bei Verwendung von Wasser als Lösungsmittel ändert sich das Absorptionsspektrum des BODIPY-FL und es werden zusätzlich zum Maximum bei 510 nm zwei Schultern sichtbar, eine bei  $\sim 480$  nm und die andere bei  $\sim 570$  nm. Diese Schultern sind eindeutig auf die Bildung von Dimeren des BODIPY auf Grund der sehr geringen Löslichkeit in Wasser zurückzuführen.

Die Integration der Absorptionsbande des Dimers  $D_I$  ergibt einen Wert, der ungefähr doppelt so groß ist wie die Integration der Monomerbande, die ihr Absorptionsmaximum bei 510 nm besitzt. Diese Tatsache ist mit einer Exciton-Kopplung innerhalb des Dimers erklärbar. In diesem Fall sind die beiden BODIPY-Moleküle in sandwichartig übereinander angeordnet, wobei die Übergangsdipole parallel zueinander ausgerichtet sind. Im Falle des Dimers  $D_{II}$  sollen die beiden Übergangsdipole kollinear angeordnet sein. Das elektronisch angeregte Monomer kann die Energie auf unterschiedliche Arten wieder abgeben, wobei ein Weg der Energietransfer zwi-

---

schen dem Monomer und dem Dimer  $D_I$  ist. Der FÖRSTER-Radius konnte in diesem Fall zu  $57 \pm 2 \text{ \AA}$  bestimmt werden [Bergstroem 2002]. Wichtig für die Fluoreszenzmessungen ist jedoch ein anderer Weg zur Abgabe der Überschussenergie des Monomers, und zwar der Energietransfer auf das Dimer  $D_{II}$ . Die Emissionsbande des Monomers überlappt mit der Absorptionsbande des  $D_{II}$  mit dem Maximum bei 577 nm, so dass es zur Ausbildung der zusätzlichen Emissionsbande kommt. Die Analyse der Emissionsspektren des BODIPY kann daher Aufschluss über die räumliche Anordnung der Fluorophormoleküle zueinander geben.

### 3.5 Differential Scanning Calorimetry

Die Differential Scanning Calorimetry (DSC) ist die wichtigste Methode zur quantitativen kalorimetrischen Untersuchung von Biomolekülen. Die so gewonnenen thermodynamischen Parameter geben Aufschluss über Phasenumwandlungen. Die hohe Empfindlichkeit der heute erhältlichen DSC-Geräte erlaubt auch die Untersuchung kleiner Substanzmengen.

Bei der DSC befinden sich die Probe P und die Referenz R in zwei gleichartigen thermisch isolierten Behältern, die einzeln beheizt und deren Temperaturen einzeln gemessen werden können. Zu Beginn einer Messung stehen beide Systeme im thermischen Gleichgewicht, Probe und Referenz werden anschließend mit einer konstanten Heizrate  $\beta$  aufgeheizt. Das Prinzip der DSC beruht nun darauf, dass die Temperatur in der Probe und in der Referenz zu jeder Zeit gleich sein sollen. Kommt es in der Probe z.B. zu einem endothermen Phasenübergang, so muss die Heizleistung  $P_P$  für die Probe größer sein als die der Referenz  $P_R$ , damit die Temperatur in den beiden Behältern wieder angeglichen werden kann. Im Falle einer exothermen Umwandlung muss die Heizleistung  $P_P$  im Vergleich zu  $P_R$  geringer ausfallen. Die primäre Messgröße der DSC ist die Differenz der Heizleistungen  $\Delta P$ :

$$\Delta P = P_P - P_R \quad (3.11)$$

Diese Differenz ist proportional zum Unterschied der Wärmekapazitäten  $\Delta C(T)$  von Probe und Referenz:

$$\Delta C(T) = \frac{\Delta P(T)}{\beta} \quad (3.12)$$

In DSC-Thermogrammen wird  $\Delta P$  gegen  $T$  aufgetragen; bei bekanntem  $\beta$  lässt sich somit nach Gleichung 3.12 die Differenz der Wärmekapazitäten zwischen Probe und Referenz und damit der sogenannte Umwandlungsanteil  $C_U$  der molaren Wärmekapazität bestimmen. Die Umwandlungsenthalpie  $\Delta_U H$  erhält man durch Integration der  $C_U(T)$ -Kurve zwischen Anfangs- ( $T_1$ ) und Endtemperatur ( $T_2$ ):

$$\Delta_U H = \int_{T_1}^{T_2} C_U(T) dT \quad (3.13)$$

## 4 Experimentelle Daten

In diesem Kapitel sollen die wesentlichen Aspekte der Probenpräparation sowie die experimentellen Besonderheiten mit den notwendigen theoretischen Grundlagen der verwendeten Messmethoden erläutert werden, soweit diese zum Verständnis der Interpretation der Ergebnisse erforderlich sind.

Für die Durchführung der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden die in biochemischen Laboratorien üblichen Chemikalien verwendet. In der Tabelle 4.1 sind die besonderen Chemikalien und ihre Bezugsquellen aufgelistet.

**Tabelle 4.1** Zusammenstellung der wichtigsten verwendeten Chemikalien und deren Bezugsquellen.

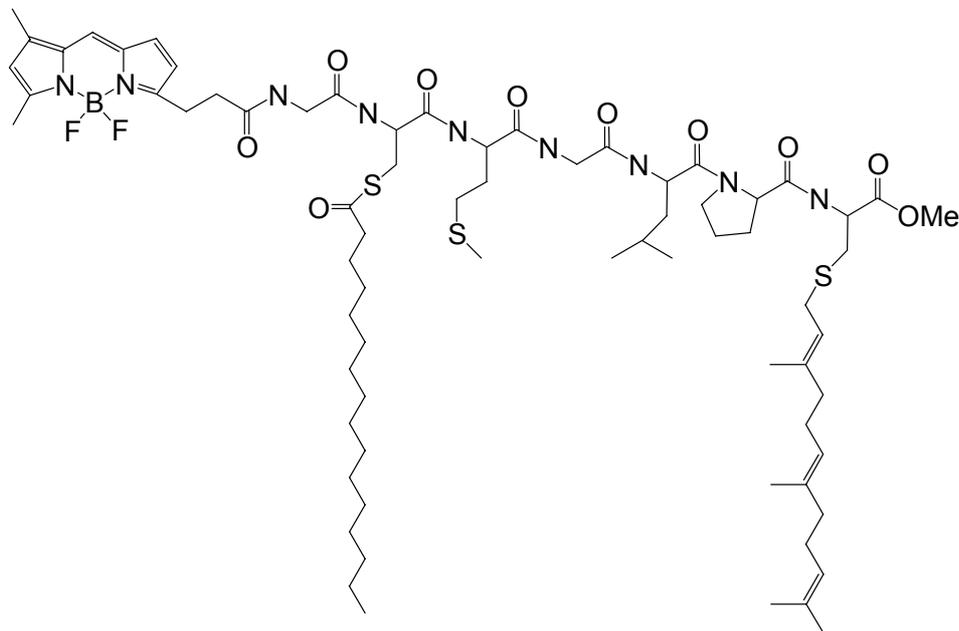
<i>Vollständiger Name</i>	<i>Abkürzung</i>	<i>Reinheit</i>	<i>Bezugsquelle</i>
1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphatidylcholin	DMPC	> 99 %	Sygena Lipids, Liestal, Schweiz
1,2-Distearoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphatidylcholin	DSPC	> 99 %	Sygena Lipids, Liestal, Schweiz
Gramicidin D	GD	> 99 %	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Cholesterol	–	> 99 %	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
6-Dodecanoyl-2-dimethylamino-naphthalen	LAURDAN	> 99 %	Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, USA
Lissamin-Rhodamin B, 1,2-dihexadecanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin	<i>N</i> -Rh-DPPE	> 99 %	Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, USA

Die Chemikalien wurden in der höchstmöglichen Reinheit und ohne weitere Aufreinigung für die Präparation der Proben eingesetzt.

## 4.1 Synthese der lipidierten Peptide

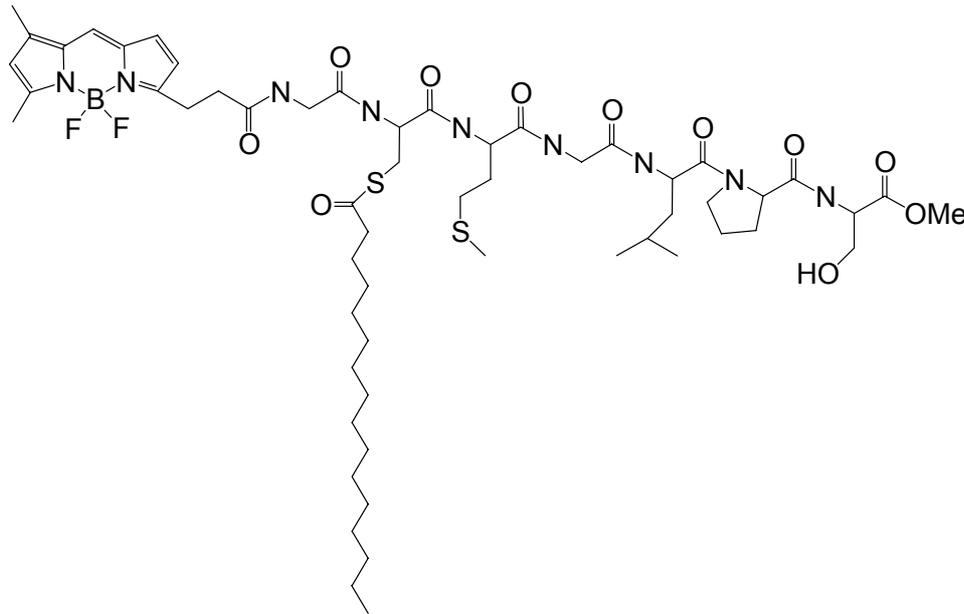
Die Synthese der lipidierten Peptide wurde von B. Ludolph, C. Peters und M. Völkert aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H. Waldmann am Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie in Dortmund durchgeführt. Am Beispiel des Peptids BL2 soll der Ablauf kurz aufgezeigt werden.

Das Peptid BL2 wurde durch eine Kombination aus Festphasen- und Flüssigphasen-Synthese hergestellt. Wie schon früher berichtet, wurde das farnesylierte und palmitoylierte Peptid Trt-Gly-Cys(Pal)-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(Far) durch die Phenylhydrazid Linker-Strategie unter Verwendung eines festen Trägers aufgebaut [Ludolph 2003]. Nach der oxidativen Abspaltung vom Harz wurde das Rohprodukt durch Säulenchromatographie gereinigt. Die aufeinanderfolgende Behandlung des Peptids mit einer Mischung aus Essigsäure und Trifluorethanol in Dichlormethan führte zur einer Abspaltung der N-terminalen Trityl-Gruppe. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt und der Rückstand durch Abdampfen mit Toluol im Vakuum getrocknet. Die freigesetzte Aminogruppe wurde acetyliert mit einer Lösung aus zuvor aktiviertem BODIPY-OH (FL) (1,5 equiv), *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N*'-Ethylcarbodiimid-Hydrochlorid (EDC, 1,5 equiv), und 1-Hydroxybenzotriazol (HOBT, 2 equiv) in Dichlormethan und in Gegenwart von Triethylamin (1,7 equiv).

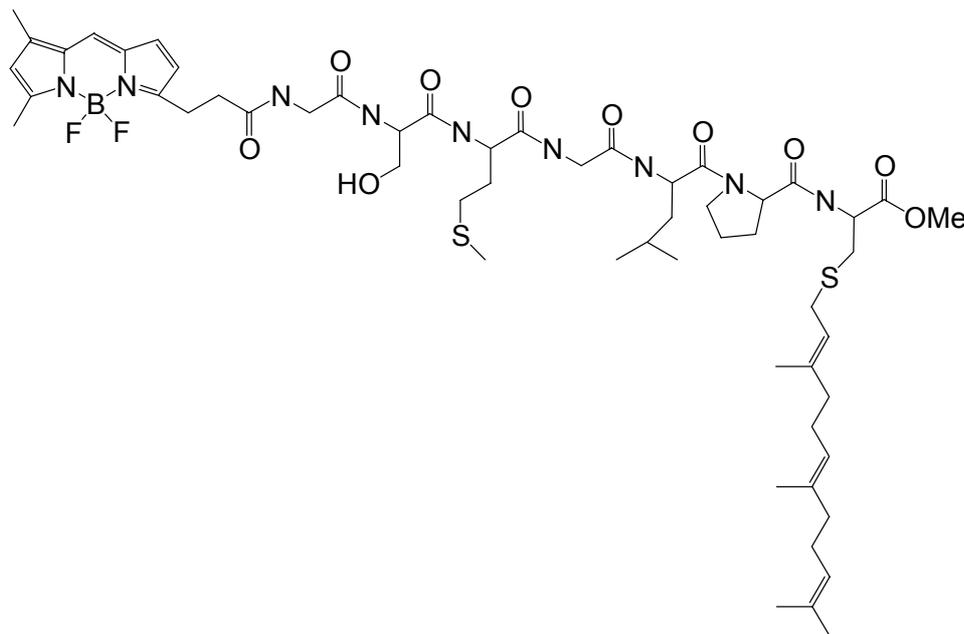


**Abbildung 4.1** Chemische Struktur des lipidierten Peptids BODIPY(FL)-Gly-Cys(Pal)-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(Far)-OMe (BL2).

Nach Aufreinigung durch Säulenchromatographie wurde das Zielpeptid BL2 in einer Gesamtausbeute von 31 % erhalten. Die Identifizierung des Produktes erfolgte über  $^1\text{H}$  NMR und über Massenspektrometrie. Neben dem BL2 wurden auch noch die Peptide CP177A und das BL258-15 synthetisiert, um den Einfluss der unterschiedlichen Lipidierung auf das Einbauverhalten zu untersuchen. Dabei ist das Peptid CP177A nur palmitoyliert, das Peptid BL258-15 nur farnesyliert.

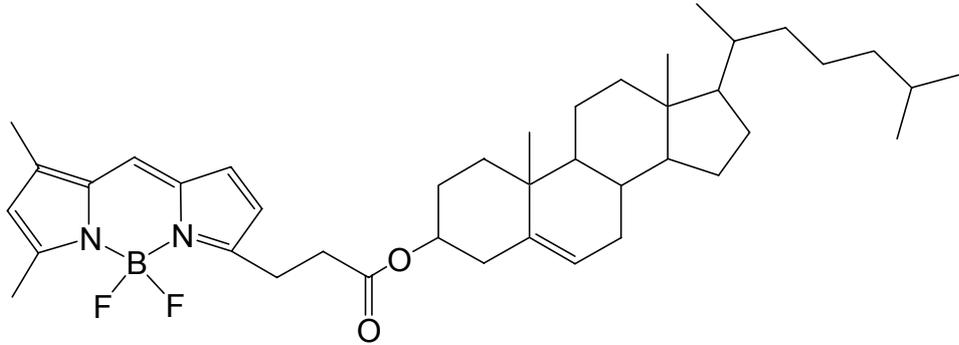


**Abbildung 4.2** Chemische Struktur des lipidierten Peptids BODIPY(FL)-Gly-Cys(Pal)-Met-Gly-Leu-Pro-Ser-Ome (CP177A).



**Abbildung 4.3** Chemische Struktur des lipidierten Peptids BODIPY(FL)-Gly-Ser-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(Far)-Ome (BL258-15).

Zur Untersuchung des Einbaus von Cholesterin in Modellmembranen wurde zusätzlich ein mit dem Fluorophor BODIPY(FL) markiertes Cholesterin hergestellt, dessen chemische Struktur in Abbildung 4.4 dargestellt ist.



**Abbildung 4.4** Chemische Struktur von BODIPY(FL)-Cholesterin.

## 4.2 Anreicherung und Isolierung der Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase

Die Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase ist kommerziell nur als sehr teures und wenig aufgereinigtes Material erhältlich, so dass für die Durchführung von ausgedehnten Versuchsreihen nur die Anreicherung und Isolierung der Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase aus den Nieren von z.B. Kaninchen oder Schweinen in Frage kommt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde im ersten Schritt eine Anreicherung des Enzyms in der Plasmamembran unter der Anleitung von Prof. Dr. E. Kinne-Saffran vom Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie in Dortmund durchgeführt. Mit diesem Material war es möglich, die grundlegenden Techniken beim Umgang mit der Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase zu erlernen und ein System zur Aktivitätsmessung unter Druck zu testen und zu etablieren. Im zweiten Schritt wurde dann zusammen mit Prof. Dr. J. Mignaco und Prof. Dr. F. Fontes vom Depto de Bioquímica Médica-ICB/CCS/UFRJ in Rio de Janeiro eine Isolierung der Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase aus Schweinenieren mit einer abschließenden SDS-Aktivierung des Enzyms durchgeführt. Ziel dieser groß angelegten Präparation war es, ausreichend Material für die weiteren geplanten biophysikalischen Experimente zu bekommen, in denen teilweise Materialmengen im Bereich von einigen Milligramm erforderlich sind.

### 4.2.1 Anreicherung der Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase

Die Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase wurde in ihrer Membran-gebundenen Form aus dem markhaltigen Nierengewebe des Kaninchens (weiße Neuseeland Kaninchen beiderlei Geschlechts, 3 kg) angereichert. Die entnommenen Nieren wurden in Eis-gekühltem ST-Puffer (250 mM Sucrose und 10 mM Triethanolamin, pH 7,4, mit HCl eingestellt) aufbewahrt. Das markhaltige Gewebe wurde sorgfältig (mit einem Stadie-Riggs Gewebe Schneider) vom Rindengewebe abgetrennt. 6 g des Gewebes wurden in 35 mL ST-Puffer in einem Waring Mixer mit einem geeigneten Adapter für geringe Volumina homogenisiert. Die Homogenisierung erfolgte 2 x für 30 s bei voller Geschwindigkeit mit einem Intervall von 60 s (bei 4°C) gekühlt. Das erhaltene Homogenisat wurde zur Abtrennung von nicht aufgebrochenem Gewebe durch ein feinporiges Tuch gedrückt. Es folgte eine Reihe von Zentrifugationsschritten, in denen die Zellmembran von Kernen, Mitochondrien und vom Endoplasmatischen Retikulum getrennt wurde. Das erhaltene Pellet besteht aus einem fest-gepackten dunkel-braunen Anteil, welcher mit einem locker-gepacktem, weisslichem Material überschichtet ist. Letzteres lässt sich durch „Verwirbeln“ entfernen. Diese Fraktion wird als Plasmamembran-Fraktion bezeichnet. Die Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase wurde um das sechsfache angereichert.

### 4.2.2 Isolierung der Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase

Die Isolierung der Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase erfolgte nach einer durch Prof. Dr. F. Fontes modifizierten Vorschrift in Anlehnung an Nørby, Dept. Biophys., Århus, 1993. Die Präparation erfolgt über einen Zeitraum von mindestens 2 Tagen.

#### Tag 1:

Frische Nieren vom Versuchstag (50 – 100 Stück) wurden auf Eis gelagert. Die Nieren wurde longitudinal (der Länge nach) aufgeschnitten. Die innere Medulla wurde freigelegt, entfernt und verworfen. Weiterhin wurde die äußere Medulla freigelegt, d.h. das pinke und rötliche Gewebe wurde entfernt und in schmale Bechergläser gegeben, welche mit etwas Lösung 1 (HS) gefüllt und auf Eis gelagert sind. Die Gesamtmenge an HS in allen Bechergläsern sollte äquivalent zu der erwarteten Menge an Gewebe sein. Pro „Batch“ sollte nicht mehr als 250 g pinkes und rötliches Gewebe eingesetzt werden. Das Binde- und Fettgewebe muss vermieden werden.

Die Proben der äußeren Medulla wurden mittels einer Edelstahl-Pressen zerkleinert (nie einen Mixer benutzen, da die spezifische Aktivität des Enzyms vermindert würde). Im ersten Schritt wurde das Gewebe durch eine Presse mit größeren Löchern gepresst und im zweiten durch eine Presse mit kleineren Löchern. Man erhält eine dicke, rötliche Gewebesuspension. Diese wurde bis zum nächsten Tag auf Eis im Gefrierschrank aufbewahrt.

Lösung 1 (HS): 30 mM Histidin, 250 mM Sucrose, pH 7,3 (20 °C)

#### Tag 2:

Die Gewebesuspension wurde zusammen mit Lösung 2 (ISE) in einen Homogenisator gegeben. Die Suspension wurde bei 1500 rpm mittels 3 Hüben unter Vermeidung von Schaumbildung und Wärmeeinwirkung homogenisiert. Aus dem Homogenisat wurde mit Lösung 2 eine 10 %ige Lösung hergestellt (Zugabe von Lösung 2, bis eine Suspension 100 g Gewebe / Liter entsteht). Die Suspension wurde 3 x für 20 min bei 6000 rpm bei 5 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde aufbewahrt und auf Eis gelagert (S1). Das Pellet wurde wie oben beschrieben in Lösung 2 rehomogenisiert und anschließend wurde das Rehomogenisat in gleichem Volumen Lösung 2 aufgenommen wie das erste Homogenisat und wie ebenfalls oben beschrieben zentrifugiert. Der Überstand (S2) wurde wiederum aufbewahrt und das Pellet verworfen. Die Überstände S1 und S2 wurden zusammengeführt und für 20 min bei 5 °C und 8500 rpm zentrifugiert. Die Geschwindigkeit der Zentrifugation wird so gewählt, dass die Mitochondrien pelletiert werden, jedoch nicht die Microsomen. Das Pellet wurde wiederum verworfen und der Überstand behalten und

erneut für 40 min bei 20000 rpm zentrifugiert. Diesmal wurde der Überstand verworfen und das Pellet, welches die gewünschten Microsomen enthält, aufbewahrt.

Das Pellet wurde in Lösung 2 (ISE) in einem Verhältnis von 33 mL ISE / 50 g vom Ausgangsgewebe resuspendiert. Die Microsomen wurden über Nacht bei -20 °C aufbewahrt. Für eine längere Periode sollte die Lagerung der Microsomen bei -80 erfolgen. Zur Bestimmung der optimalen SDS-Aktivierungskonzentration muss ein Aliquot von 3 mL getrennt aufbewahrt werden.

Lösung 2 (ISE): 25 mM Imidazol, 250 mM Sucrose, 1 mM EDTA, pH 7,4 (20 °C)

### 4.2.3 Aktivierung der Microsomen mit SDS

Die Microsomen bestehen neben dem gewünschten Enzym zu einem großen Teil aus Lipiden. Diese Lipide können durch die Verwendung von Detergenzien soweit entfernt werden, dass nur noch das Enzym mit den sehr fest gebundenen Lipidmolekülen übrig bleibt. Ganz entscheidend ist die Bestimmung der optimalen Detergenkonzentration, um eine möglichst große Aktivität des Enzyms bei einer möglichst geringen Konzentration an Detergens zu erhalten.

#### I. Bestimmung der optimalen Konzentration: Aktivierungskurve

Das Aliquot wurde aufgetaut und die Microsomen mit Lösung 2 auf 4,6 g Protein/mL verdünnt. Es wurden 14 Aliquots von je 80 µl der verdünnten Microsomenlösung verwendet. Ausgehend von einer Stammlösung 1 g SDS / 100 mL ISE wurde eine Verdünnungsreihe mit folgenden SDS-Konzentrationen in g/100 mL hergestellt:

0 – 0,1 – 0,2 – 0,3 – 0,35 – 0,4 – 0,45 – 0,5 – 0,55 – 0,6 – 0,65 – 7 – 0,75 – 0,8

Die 14 Verdünnungen von je 0,1 mL wurden für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. Zu jeder Lösung wurden 900 µl Lösung 2 hinzugegeben und die Aktivität der ATPase nach FISKE und SUBBAROW [Fiske 1925] und/oder die pNPPase-Aktivität gemessen.

Wichtige Anmerkungen:

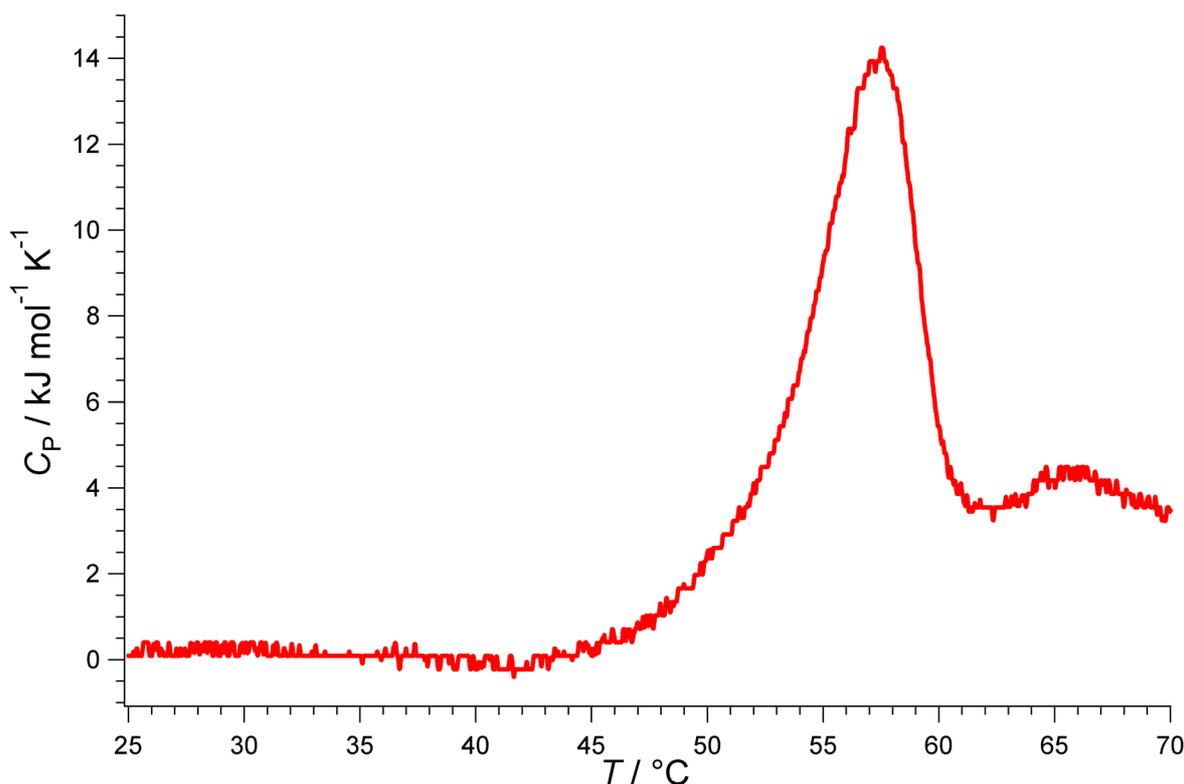
- 1) Während der Aktivierung darf kein ATP vorhanden sein
- 2) Das Maximum der Aktivierungskurve sollte zwischen 0,4 % und 0,5 % SDS liegen. Falls nicht das Maximum verwendet wird, sollte eine geringere Konzentration gewählt werden. SDS-Konzentrationen zwischen 0,7 % und 0,8 % weisen auf eine geringere spezifische Aktivität und damit auf eine schlechtere Qualität des Ausgangsmaterials hin.

## II. Aktivierung der Microsomen

Die Microsomen wurden auf 4,6 g Protein/mL mit Lösung 2 verdünnt. Zu den Microsomen wurde die geeignete SDS-Konzentration (in ISE), die aus der vorangegangenen Aktivitäts-Kurve ermittelt wurde, unter Rühren vorsichtig hinzugefügt (1 Teil SDS-Lösung für 4 Teile Microsomen-Lösung). Die aktivierten Microsomen wurden über Nacht bei Raumtemperatur gelagert. Die Microsomen wurden 5 x bei 40000 rpm für 50 min bei 10 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde aufbewahrt. Nach jeder Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Pellet in Lösung 2 mittels einer „Presse“ (3 x hoch und runter bei 1500 rpm) homogenisiert.

Nach der letzten Zentrifugation wurde das Pellet in einer geringeren Menge Lösung 2 aufgenommen, so dass die Endkonzentration des Proteins um 5 mg/mL liegt (2,7 g/mL vom Ausgangsgewebe).

Ein Aliquot wurde zur Bestimmung der Proteinreinheit und der Aktivität abgenommen. Die Lagerung erfolgt bei -20°C.



**Abbildung 4.5** Basislinienkorrigiertes DSC-Thermogramm von ~ 20 mg der SDS-aktivierten Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase.

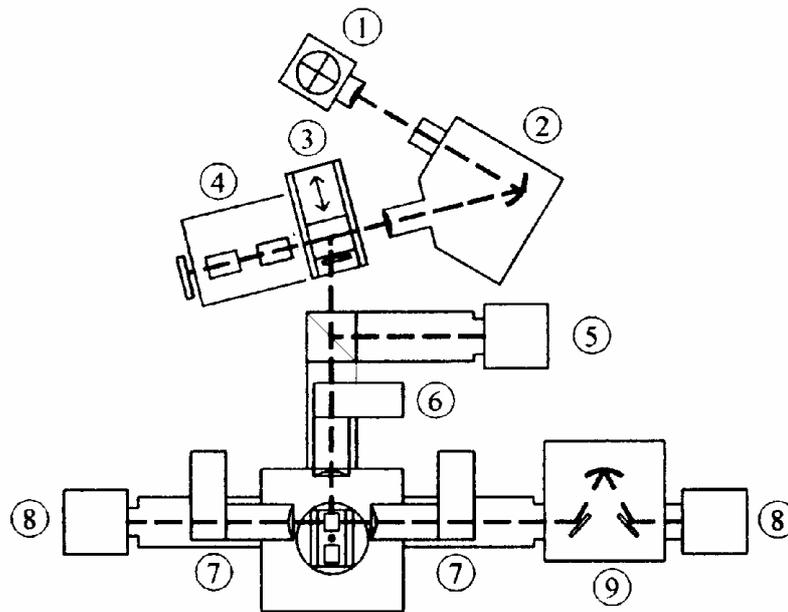
---

Das Ergebnis der Präparation ist ein Enzym mit einer sehr hohen Reinheit. Dies konnte durch eine Gel-Elektrophorese mit anschließendem Western-Blot bestätigt werden. Ein DSC-Thermogramm der SDS-aktivierten Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase ist in Abbildung 4.5 dargestellt. Das Thermogramm zeigt in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus anderen Präparationen einen für so große Proteine wie die Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase typischen Peak mit einem Maximum bei einer Temperatur von ~ 58 °C (Grell 2001, Grinberg 2001). Dieser Peak lässt sich auf die partielle Denaturierung der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit der Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase zurückführen (Grinberg 2001).

## 4.3 Fluoreszenzspektroskopie

### 4.3.1 Das Fluoreszenzspektrometer K2

Zur Durchführung der statischen fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen wurde ein Spektrometer vom Typ K2 der Firma ISS (Urbana, IL) verwendet, das zusätzlich mit dem Photon-Counting-Modus ausgestattet ist. Das Spektrometer ist schematisch in Abbildung 4.6 dargestellt.



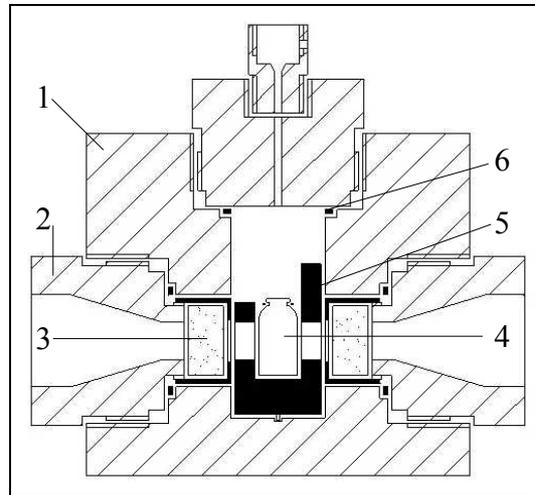
**Abbildung 4.6** Schematische Darstellung des Phasen- und Modulationsspektrometers des Typs K2 von ISS (1 Xenon-Bogenlampe, 2 Anregungsmo-  
nochromator, 3 2-Wege-Polarisator, 4 Pockelszelle, 5 Referenz-Detektor, 6 Anregungspolarisator, 7 Emissionspolarisator, 8 Proben-Detektor, 9 Emissionsmo-  
nochromator).

Als Strahlungsquelle (1) dient eine Xenon-Bogenlampe, die sich durch eine relativ hohe Strahlungsintensität im Wellenlängenbereich von  $\lambda \approx 250 - 1100$  nm auszeichnet. Das emittierte Licht wird mit Hilfe einer Linse auf den Eintrittsspalt des Anregungsmo-  
nochromators (2) fokussiert. Die spektrale Zerlegung innerhalb dieses Monochromators erfolgt an einem konkaven, holographischen Gitter, welches mit 1200 Linien pro Millimeter die Auswahl einer zentralen Wellenlänge in dem Spektralbereich von  $\lambda = 200 - 860$  nm in Schritten von  $\Delta\lambda = 0,25$  nm erlaubt. Aus dem energetisch aufgespaltenen Spektrum bei feststehender Breite von Eintritts- und Aus-  
trittsspalt werden schmale Spektralbereiche konstanter Weite (4, 8 oder 16 nm) selektiert. Das monochromatische Licht wird anschließend über einen Spiegel, der an der Ecke eines Zwei-  
Wege-Polarisators (3) befestigt ist, direkt auf einen Strahlteiler gelenkt. Ein Teil der Strahlung wird über eine Rhodamin B-Referenz-Probe auf den Referenzdetektor (5) weitergeleitet. Da das

Referenzmolekül Rhodamin B Strahlung des gesamten Spektralbereiches von  $\lambda = 220 - 600$  nm absorbiert und mit konstant hoher Quantenausbeute fast ausschließlich bei  $\lambda = 630$  nm emittiert, wird diese Substanz häufig als sogenannter „Quantum Counter“ in der statischen Fluoreszenzspektroskopie eingesetzt [Lakowicz 1999]. Unabhängig von der wellenlängenabhängigen Effizienz des Detektors kann somit die Emission der Probe im Hinblick auf die Wellenlängenabhängigkeit der Intensität der Anregungsstrahlung und auf etwaige zeitabhängige Intensitätsfluktuationen korrigiert werden. Der andere Teil der Anregungsstrahlung gelangt über eine fokussierende Linse in den Probenraum. Zur Messung der statischen Anisotropie kann zwischen Strahlteiler und Linse ein Anregungspolarisator (6) in den Strahlengang gebracht werden. In dem Probenraum befinden sich entweder zwei temperierbare Küvettenhalter oder ein thermostatisierter Hochdruckautoklav (S. Abb. 4.7). Die Detektion der Emission kann über die beiden Photomultiplier (8) auf der linken und auf der rechten Seite des Probenraumes erfolgen. Dabei wird die emittierte Fluoreszenzstrahlung zunächst durch eine Linse gebündelt. Die gebündelte Emissionsstrahlung gelangt dann unpolarisiert zum Detektor. Zur Messung der Anisotropie können die Emissionspolarisatoren (7) in den Strahlengang gebracht werden. Zusätzlich ist in beiden Detektionswegen direkt hinter den Polarisatoren eine Halterung für optische Filter angebracht. Im rechten Emissionskanal wird das von der Probe emittierte Licht durch den im Strahlengang befindlichen Emissionsmonochromator (9) spektral zerlegt. Ebenso wie der Anregungsmonochromator enthält diese Einheit als dispersives Element ein konkaves, holographisches Gitter mit 1200 Linien pro Millimeter. Der optimale Arbeitsbereich ist bei diesem Gitter jedoch auf den Wellenlängenbereich von  $\lambda = 320 - 800$  nm beschränkt. Auf Grund der Wellenlängenabhängigen Effizienz des Monochromators werden die Spektren mit Hilfe eines Korrekturspektrums korrigiert.

Für die Durchführung der druckabhängigen Untersuchungen wurde eine Hochdruckzelle von der Firma ISS verwendet. Ihr Aufbau ist in Abbildung 4.7 dargestellt. Die Montage auf einer speziellen Halterung erlaubt die exakte Positionierung der Hochdruckzelle innerhalb des Strahlengangs. Ausgestattet mit drei Quarzglasfenstern ist dieser Autoklav für einen Maximaldruck von 3 kbar ausgelegt. Um Korrosionsschäden innerhalb der Hochdruckzelle zu vermeiden, wird als Druckmedium spektroskopisch reines Ethanol verwendet. Als Probenbehältnis dient ein Quarzglasfläschchen, welches mit einem Ethanol-beständigen Schlauch aus Polyurethan mit Teflonstopfen verschlossen wird. Zur Druckerzeugung wird ein System zur automatisierten Druckgeneration und Kontrolle von APP (Ithaca, NY, USA) verwendet. Dieses **automated pressure control system** (APCS) besteht aus einem motorisierten Druckgenerator, einem Druckmesskopf,

zwei motorisierten Ventilen und einer Steuereinheit. Die Bedienung des Druckgenerators erfolgt mit Hilfe eines Computers über die entsprechende Treiber-Software (APCSwin V5.0).



**Abbildung 4.7:** Querschnitt der von ISS konstruierten Hochdruckzelle, 1: Druckzelle, 2: Fensterschraube, 3: Quarzglasfenster, 4: Probenbehältnis (Quarzglas), 5: Halterung, 6: O-Ring.

Der verwendete Druckmesskopf ist für einen Druckbereich bis zu 60000 psi (ca. 4100 bar) ausgelegt. Dabei wird die Genauigkeit des Druckmesskopfes vom Hersteller mit 30 psi (ca. 2,1 bar) angegeben. In den fluoreszenzspektroskopischen Experimenten wurde der Druck mit einer Rate von  $\sim 500 \text{ bar min}^{-1}$  eingestellt.

### 4.3.2 Proben für statische Fluoreszenzspektroskopie

Von den Phospholipiden DMPC und DSPC wurden Stammlösungen in Chloroform mit einer Konzentration von jeweils  $10 \text{ mg mL}^{-1}$  hergestellt. Für die Messungen an den reinen Lipiden wurden jeweils  $2 \text{ mg}$  Lipid ( $200 \text{ }\mu\text{L}$ ) verwendet, für die äquimolare Mischung aus DMPC und DSPC wurden  $0,92 \text{ mg}$  ( $92 \text{ }\mu\text{L}$ ) DMPC und  $1,08 \text{ mg}$  DSPC ( $108 \text{ }\mu\text{L}$ ) gemischt.

#### Proben mit Gramicidin

Aus dem Gramicidin wurde eine Stammlösung in Chloroform mit einer Konzentration von  $5 \text{ mg mL}^{-1}$  hergestellt, die Konzentration der LAURDAN-Stammlösung in Chloroform betrug  $1 \text{ mM}$ . Zu den Lipiden wurde die entsprechende Menge an Gramicidin zugegeben, um bezogen auf die Gesamtmenge an Lipid ein Verhältnis Lipid/GD von 8:1 (w/w) zu erhalten. Dies entspricht einer Konzentration von  $\sim 5 \text{ mol\%}$  im Falle des DMPC/DSPC. Durch Zugabe von  $5 \text{ }\mu\text{L}$  Laurdan-Stammlösung wurde ein molares Verhältnis Phospholipid/Fluorophor von  $\sim 550:1$  eingestellt.

#### Proben mit Cholesterol

Aus dem Cholesterol wurde eine Stammlösung in Chloroform mit einer Konzentration von  $5 \text{ mg mL}^{-1}$  hergestellt, die Konzentration der LAURDAN-Stammlösung in Chloroform betrug  $1 \text{ mM}$ . Zu den Lipiden wurde die entsprechende Menge an Cholesterol zugegeben, um bezogen auf die Gesamtstoffmenge an Lipid Konzentrationen von  $5 - 50 \text{ mol\%}$  zu erhalten. Durch Zugabe von  $5 \text{ }\mu\text{L}$  LAURDAN-Stammlösung wurde ein molares Verhältnis Phospholipid/Fluorophor von  $\sim 550:1$  eingestellt.

#### Proben mit den lipidierten Peptiden

Aus den lipidierten Peptiden wurden Lösungen in Chloroform hergestellt. Zu den Lipiden wurde die entsprechende Menge an Peptid zugegeben, um bezogen auf die Gesamtstoffmenge an Lipid eine Konzentration von  $2 \text{ mol \%}$  zu erhalten.

Die so aus den Lipiden und den verschiedenen anderen Komponenten hergestellten Lösungen wurden im Stickstoffstrom eingengt und das restliche Chloroform über Nacht in der SpeedVac SC 110 (Savant Instruments, Holbrook, NY) bei  $10^{-1} \text{ mbar}$  entfernt. Der getrocknete Lipidfilm wurde in  $1 \text{ mL}$   $50 \text{ mM}$  Phosphatpuffer, pH 7,4, hydratisiert. Zur Gewährleistung einer homogenen Hydratisierung der Lipide wurden mindestens fünf Freeze-Thaw-Vortex-Zyklen durchgeführt. Hierbei wird die Dispersion in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend im Tem-

perierbad auf eine Temperatur erwärmt, bei der sich die Lipide in einem flüssigkristallinen Zustand befinden. Durch die Zugabe von weiteren 2 mL Phosphatpuffer wird ein Endvolumen von 3 mL eingestellt. Die Lösung wird in eine Fluoreszenzküvette gegeben und die Messung sofort begonnen.

### **4.3.3 Durchführung der Messungen**

Die Experimente wurden in einer 1 cm x 1 cm Quarzküvette für die Fluoreszenzspektroskopie durchgeführt. Die Proben wurden mit Hilfe eines Magnetrührers ständig durchmischt und die Temperierung erfolgte durch einen externen F 25-MV-Thermostaten (Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach) mit einer Genauigkeit von 0,1 °C. Vor jeder Messung wurde die Probe für 10 min thermisch äquilibriert.

#### **Gramicidin und Cholesterol**

Für die Messungen mit LAURDAN wurde eine Anregungswellenlänge von 390 nm gewählt und die Emissionsspektren wurden zwischen 410 nm und 700 nm mit einer Schrittweite von 1 nm aufgenommen. Anregungsspektren wurden bei einer Emissionswellenlänge von 440 nm bei Anregungswellenlängen zwischen 250 nm und 420 nm aufgenommen. Bei allen Spektren wurde bei jeder Wellenlänge über 5 Integrationen gemittelt. Die GP-Werte wurden mit Hilfe der Spektrometer-Software bei den Wellenlängen 440 nm und 490 nm über einen Zeitraum von 30 s (5 Integrationen) bestimmt, wobei die geringere Empfindlichkeit des Emissionsmonochromators bei 490 nm im Vergleich zu 440 nm durch einen Korrekturfaktor in der Software korrigiert wurde.

#### **Lipidierte Peptide**

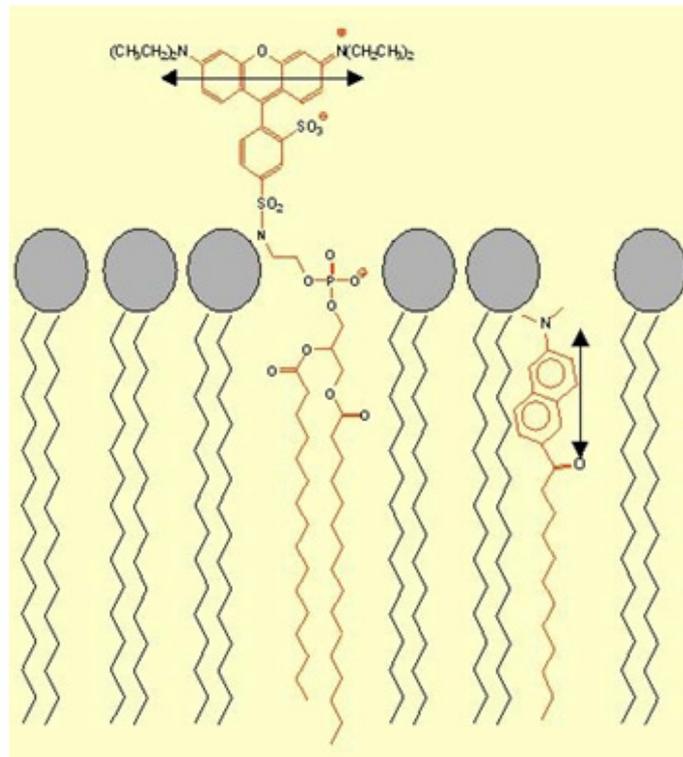
Die Detektion der Emission des BODIPY erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 495 nm. Emissionsspektren wurden zwischen 510 nm und 700 nm mit einer Schrittweite von 1 nm aufgenommen.

## 4.4 Fluoreszenzmikroskopie

Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen unter Verwendung der Zwei-Photonenanregung wurden am Laboratory for Fluorescence Dynamics (LFD) der Universität von Illinois in Urbana/Champaign unter der Leitung von Prof. Dr. E. Gratton durchgeführt.

Für die Experimente wird ein inverses Mikroskop vom Typ Axiovert 35 (Zeiss, Thornwood, NY) verwendet [So 1995], als Objektiv dient ein LD-Achroplan 20x mit einem großen Arbeitsabstand (Zeiss, Holmdale, NJ) und einer numerischen Apertur N.A. von 0,4. Ein Titan-Saphirlaser (Mira 900, Coherent, Pao Alto, CA), der durch einen Nd:Vanadatlasers mit verdoppelter Frequenz gepumpt wird, wird als Lichtquelle für die Anregung verwendet. In allen Experimenten beträgt die Anregungswellenlänge 780 nm. Die Leistung des Laserstrahls vor Eintritt in das Mikroskop beträgt  $\sim 70$  mW. Zum Scannen in x- als auch in y-Richtung wird der Laserstrahl durch einen XY-Scanner (Cambridge Technology, Water-Town, MA) geführt. Die Scanrate wird durch ein Eingangssignal von einem Frequenzgenerator (Hewlett-Packard, Santa Clara, CA) kontrolliert; eine frame rate von 25 s wird verwendet, um ein Bild mit 256 x 256 Pixeln zu bekommen. Um die Polarisierung des Laserstrahls von linear in zirkular zu ändern, wird ein Viertelwellenlängenplättchen (CVI Laser Corporation, Albuquerque, NM) hinter dem Polarisator platziert. Die Fluoreszenzemission wird durch einen breiten Bandpass-Filter zwischen 350 nm und 600 nm (BG39, Chroma Technology, Brattleboro, VT) detektiert. Zur Messung der GP-Werte von LAURDAN werden zwei zusätzliche optische Bandpass-Filter mit einer Weite von 46 nm und einem Maximum von 446 nm bzw. 499 nm (Ealing Electro-Optics, New Englander Industrial Park, Holliston, MA) verwendet, um die Fluoreszenz in der blauen und in der grünen Region des Emissionsspektrums von LAURDAN zu detektieren [Yu 1996, Parasassi 1997, Bagatolli 1999]. Ein Fluorescein/Texas Red-Filterset wird benutzt, um die Emission von *N*-Rh-DPPE und BODIPY simultan in zwei Kanälen zu detektieren. Dabei ist der grüne Filter ein Chroma HQ525/50 (500-550 nm), der rote Filter ein Chroma HQ610/75 (573-648 nm). Beide sind für die Multiphotonenverwendung beschichtet. Die Emission wird durch einen Miniatur-Photomultiplier (R5600-P, Hamamatsu, Bridgewater, NJ) im Photon-Counting-Modus detektiert.

In Abbildung 4.8 ist der Einbau der Fluorophore *N*-Rh-DPPE und LAURDAN in eine Lipidmembran schematisch dargestellt. Das Dipolmoment von LAURDAN ist parallel zu den Kohlenwasserstoffketten der Lipidmoleküle ausgerichtet; das Dipolmoment von *N*-Rh-DPPE senkrecht dazu.



**Abbildung 4.8** Schematische Darstellung des Einbaus der Fluorophore *N*-Rh-DPPE und LAURDAN in eine Lipidmembran.

Auf Grund der Polarisierung des Laserstrahls werden in den Experimenten mit dem Fluorophor *N*-Rh-DPPE Fluoreszenzmikroskopiebilder von den Oberflächen der Vesikel aufgenommen, da es nur in dieser Region zu einer effektiven Anregung der Fluorophormoleküle (Photos Selektion) kommt. Im Gegensatz dazu werden in den Experimenten mit LAURDAN Querschnitte der Vesikel mikroskopiert, da nur in dieser Anordnung das Dipolmoment von LAURDAN parallel zur Anregungsstrahlung orientiert ist.

### 4.4.1 Proben für die Fluoreszenzmikroskopie

#### Präparation der GUV

Von den Lipiden werden Stammlösungen in Chloroform mit einer Konzentration von  $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$  hergestellt. Zur Bildung der GUV wird die Elektroformationsmethode nach Angelova und Dimitrov [Angelova 1986, 1992, Dimitrov 1987] angewandt; dabei wachsen die Vesikel in einer speziellen temperierbaren Kammer (s. Abb. 4.9.). Für eine detaillierte Beschreibung der Kammer siehe [Bagatolli 1999].



**Abbildung 4.9** Darstellung der zur Bildung der GUV verwendeten Kammer.

Der Prozess der GUV-Bildung beinhaltet die folgenden Schritte:

- 1) Auf die beiden Platindrähte werden jeweils  $2 \mu\text{L}$  der Lipidlösung in Form von sehr feinen Tropfen unter einem Stickstoffstrom aufgegeben. Die Reste des organischen Lösungsmittels werden anschließend mit Hilfe eines Lyophilisierers entfernt.
- 2) Die Unterseite der Kammer wird mit einem Deckgläschen verschlossen und die Kammer mit Wasser (Millipore,  $17,5 \text{ M}\Omega\text{cm}$ ) gefüllt, das vorher auf eine Temperatur von  $\sim 65 \text{ }^\circ\text{C}$  erwärmt wurde. Direkt im Anschluss wird zwischen den beiden Platindrähten für  $\sim 90 \text{ min}$  ein elektrisches Feld angelegt (AC,  $10 \text{ Hz}$ ,  $3 \text{ V}$ , sinusförmig moduliert).

Nach der Bildung der Vesikel wird das elektrische Feld abgeschaltet und die temperaturabhängige Messung von hohen zu tiefen Temperaturen kann beginnen. Eine CCD-Videokamera im Mikroskop ermöglicht das Beobachten der Vesikelbildung und das einfache Selektieren für die anschließende Fluoreszenzmikroskopie. Die Temperatur wird innerhalb der Zelle in der Nähe der Platindrähte mit einem digitalen Thermoelement (Model 400B, Omega, Stamford, CT) mit einer Genauigkeit von  $0,1 \text{ }^\circ\text{C}$  gemessen.

### **Präparation der GU mit Gramicidin**

Von den Lipiden DMPC und DSPC sowie dem Peptid GD wurden Stammlösungen in Chloroform hergestellt. Die Konzentration der Lipidstammlösungen betrug  $2 \text{ mg mL}^{-1}$ , die des GD  $5 \text{ mg mL}^{-1}$ . Die Lösungen werden so gemischt und verdünnt, dass am Ende eine Lipidlösung mit einer Konzentration von  $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$  entsteht. Das Verhältnis DMPC/DSPC betrug 1:1 (mol/mol) und das Verhältnis Lipid/GD 8:1 (w/w), dies entspricht  $\sim 5 \text{ mol\%}$ . Die Fluorophore LAURDAN und *N*-Rh-DPPE wurden mit den Lipiden in Chloroform vermischt, das Verhältnis LAURDAN/Lipid betrug 1:50 (mol/mol). Dabei sind die geringe Lipidkonzentration und der Verteilungskoeffizient von LAURDAN zu berücksichtigen; dies führt zu einer deutlich geringeren Konzentration von LAURDAN in den Vesikeln. Das Verhältnis *N*-Rh-DPPE/Lipid beträgt 1:100 (mol/mol). Die so hergestellte Lipidlösung wurde dann gemäß der Vorschrift zum Wachstum der Vesikel eingesetzt.

### **Präparation der GU mit Cholesterol**

Von den Lipiden DMPC und DSPC sowie dem Cholesterol wurden Stammlösungen in Chloroform hergestellt. Die Konzentration der Lipidstammlösungen betrug  $2 \text{ mg mL}^{-1}$ , die vom Cholesterol  $5 \text{ mg mL}^{-1}$ . Die Lösungen werden so gemischt und verdünnt, dass am Ende eine Lipidlösung mit einer Konzentration von  $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$  entsteht. Die Konzentration an Cholesterol betrug 10 mol%, 20 mol% und 33 mol% bezogen auf die Menge an Phospholipid. Die Zugabe der Fluorophore erfolgte wie bei den Proben mit Gramicidin. Die Probe mit dem BODIPY-markierten Cholesterol wurde auf demselben Weg hergestellt und enthielt 3 mol% Cholesterol.

### **Präparation der Proben mit den lipidierten Peptiden**

Von den Lipiden DMPC und DSPC sowie den lipidierten Peptiden BL2, CP177A und B257A-A wurden Stammlösungen in Chloroform hergestellt. Die Konzentration der Lipidstammlösungen betrug  $2 \text{ mg mL}^{-1}$ . Die Lösungen werden so gemischt und verdünnt, dass am Ende eine Lipidlösung mit einer Konzentration von  $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$  entsteht. Das Verhältnis DMPC/DSPC betrug 1:1 (mol/mol) und das Verhältnis Lipid/lipidiertes Peptid 50:1 (mol/mol) bzw. 25:1 (mol/mol). Der Fluorophor *N*-Rh-DPPE wurde mit den Lipiden in Chloroform vermischt, das Verhältnis *N*-Rh-DPPE/Lipid betrug 1:100 (mol/mol) bzw. 1:400 (mol/mol) in den Zweikanalexperimenten. Die so hergestellte Lipidlösung wurde dann gemäß der Vorschrift zum Wachstum der Vesikel eingesetzt.

### **Präparation der Proben mit dem Ras-Proteinfragment**

Für die Präparation der Proben mit dem Fragment des Ras-Proteins konnte der übliche Weg über das Chloroform nicht verwendet werden, da dies zu einer Zerstörung der Proteinstruktur geführt hätte. Die sehr geringe Menge an Protein ( $\sim 0,1 \mu\text{g}$ ) wurde daher in  $100 \mu\text{L}$  Wasser gelöst und nach der Bildung der Vesikel aus DMPC/DSPC 1:1 (mol/mol) ohne einen Fluorophor in die Kammer injiziert. Die Temperatur in der Kammer betrug  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ .

#### **4.4.2 Durchführung der Messungen**

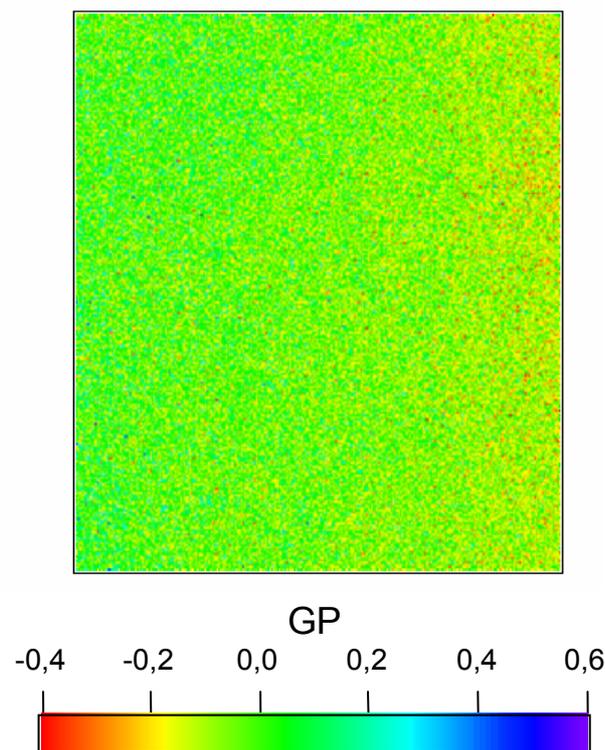
Nach der Bildung der Vesikel und der Abschaltung des elektrisches Feldes kann die Messung gestartet werden. Die in der Nähe der Drähte vorliegende Temperatur von  $\sim 60 \text{ }^\circ\text{C}$  wurde in Schritten von  $\sim 4 \text{ }^\circ\text{C}$  langsam verringert, um größere Temperaturgradienten in der Kammer zu vermeiden, da diese leicht zur Ablösung der Vesikel vom Draht führen können. Mit Hilfe der CCD-Kamera können gezielt große und gut ausgebildete Vesikel gefunden und als Funktion der Temperatur mikroskopiert werden. Dabei werden nacheinander mehrere Bilder aufgenommen und entweder zu einem Gesamtbild mit höherer Intensität addiert oder als Einzelbildabfolge für Videos gespeichert. Im Falle der Proben mit LAURDAN wurden auf Grund der geringeren Intensität in den beiden Kanälen zwischen 15 und 20 Bilder bei einer Temperatur aufgenommen und aus dem so gewonnenen Bild das GP-Image berechnet (s. Kapitel 4.4.3).

Der Einbau des Proteins wurde nach der Injektion der Proteinlösung in die Kammer als Funktion der Zeit beobachtet. Dazu wurde mit Hilfe der CCD-Kamera ein Bereich des Drahtes mit geeigneten Vesikeln ausgewählt und dieser mikroskopiert. Durch die Zugabe des Proteins mit dem markierten Ankerkonstrukt kommt es zunächst zu einem starken Fluoreszenzsignal aus dem Lösungsmittel, bis nach einigen Minuten der Einbau des Proteins in die Vesikel in den Bildern sichtbar wird.

### 4.4.3 Auswertung der Fluoreszenzmikroskopiebilder

Die aufgenommenen Bilder mit den Fluorophoren BODIPY und *N*-Rh-DPPE können ohne weitere Verarbeitung verwendet werden. Anders ist dies im Fall des LAURDAN. Der übliche Weg zur Erstellung der GP-Bilder soll hier kurz dargestellt werden. Zur Auswertung wird die Software IgorPro (Wavemetrics, Oregon) verwendet.

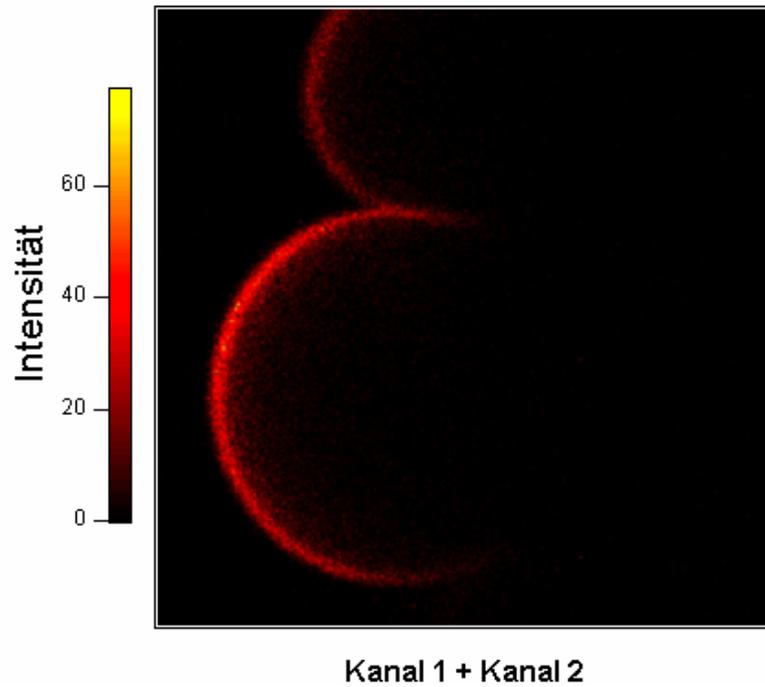
Die verwendeten Filter im Mikroskop sowie Unterschiede in den Detektorempfindlichkeiten führen zu einer Abweichung der gemessenen GP-Werte von denen, die durch die Spektroskopie erhalten werden. Wichtiger aber noch ist die Tatsache, dass es auf Grund von Abweichungen von der optimalen Anordnung der optischen Komponenten im Strahlengang zu einer unterschiedlichen Empfindlichkeit in verschiedenen Bildregionen kommt. Aus diesem Grund wird zu Beginn einer Messung ein Korrektur-Bild aufgenommen. Dies wird durch die Verwendung einer Lösung von LAURDAN in DMSO mit bekanntem GP-Wert erhalten. Abbildung 4.10 zeigt ein typisches GP-Image einer Lösung von LAURDAN in DMSO:



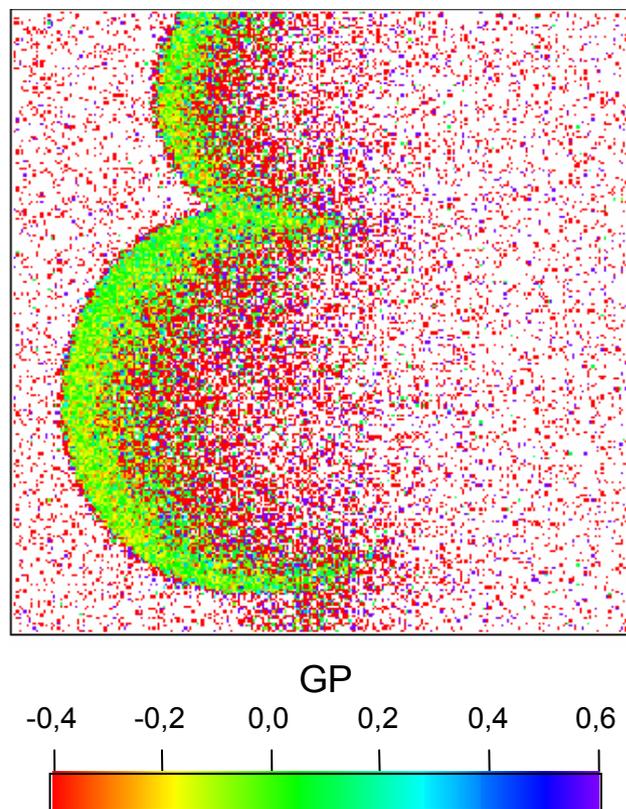
**Abbildung 4.10** GP-Bild einer Lösung von LAURDAN in DMSO.

Es ist deutlich zu erkennen, dass im rechten Bereich des Bildes die GP-Werte geringer sind als im übrigen Bild. Im nächsten Schritt werden dann die Originalbilder der jeweiligen Messung geladen. In Abbildung 4.11 sind die Bilder der beiden Kanäle 1 und 2 addiert dargestellt. Im Ka-

nal 1 wird in den Messungen mit LAURDAN die Intensität der Emission bei 446 nm detektiert, im Kanal 2 die Emission bei 499 nm. Abbildung 4.12 zeigt das dazugehörige GP-Bild.



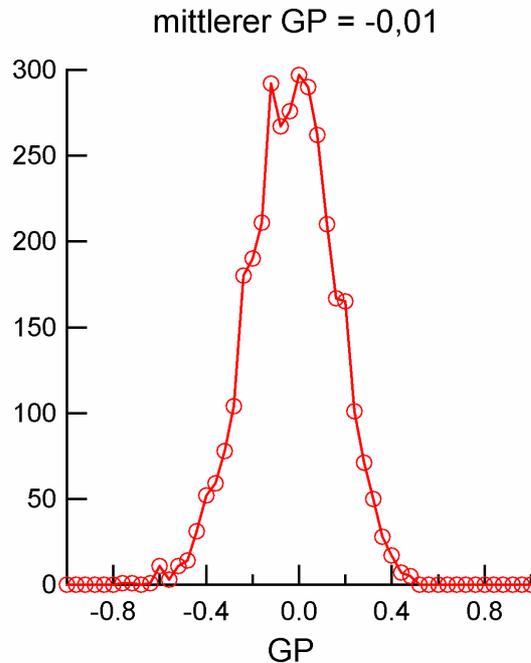
**Abbildung 4.11** Originalbilder, die Intensitäten aus den beiden Kanälen wurden addiert.



**Abbildung 4.12** GP-Bild, berechnet aus den Intensitäten der Kanäle der Originaldaten.



Im letzten Schritt wird nun die eigentliche Korrektur des GP-Bildes durchgeführt. Dazu wird aus dem GP-Bild der Lösung von LAURDAN in DMSO (s. Abb. 4.10) von der verwendeten Software ein Korrekturbild berechnet, das nun mit dem GP-Bild der Probe (s. Abb. 4.13) multipliziert wird. Abbildung 4.15 zeigt das zu diesem GP-Bild gehörige Histogramm.



**Abbildung 4.15** Histogramm des GP-Bildes aus Abbildung 4.12 nach Verwendung des Korrekturbildes.

Deutlich zu erkennen ist der Unterschied im mittleren GP-Wert vor und nach der Korrektur. Die neuen GP-Werte stimmen jetzt sehr gut mit denen aus fluoreszenzspektroskopischen Messungen überein und können daher miteinander verglichen werden. Mit Hilfe einer Prozedur der verwendeten Software kann nun ein gewünschter Bereich des Vesikels ausgewählt und das Histogramm für diesen Bereich separat berechnet werden. Somit ist es möglich, ein einziges Vesikel aus einem Bild mit mehreren Vesikeln auszuwählen und einzeln auszuwerten.

## 4.5 Absorptionsspektroskopie

Die Absorptionsspektren sowie die Extinktionen bei definierten Wellenlängen wurden mit einem Zweistrahlsspektrometer des Typs Lambda 25 von Perkin Elmer (Düsseldorf) aufgenommen. Das Gerät besitzt einen Spektralbereich von 190 bis 1100 nm und eine spektrale Bandbreite von 1 nm. Die Aufnahme der Spektren erfolgte mit einer Scangeschwindigkeit von 120 nm/min. Zur Korrektur der Absorptionswerte wurde jeweils die Absorption des Lösungsmittels bzw. des Puffers verwendet.

## 4.6 DSC-Messungen

Die Aufnahme der Thermogramme der DSC-Messungen erfolgte mit einem VP DSC Mikrok calorimeter der Firma Microcal (Northhampton, MA). Das Zellvolumen beträgt jeweils 0,51 mL, die Referenzzelle wurde jeweils mit dem entsprechenden Probenpuffer befüllt. Vor jeder Messung wurden die Lösungen unter Verwendung der ThermoVav (Microcal, Northhampton, MA) entgast. Durch den Aufbau eines Druckes von 1,8 bar innerhalb der Zellen wird die Blasenbildung besonders bei höheren Temperaturen reduziert. Die Subtraktion der Basislinie, die Normierung auf die eingesetzte Probenkonzentration sowie die weiteren Auswertungen wurden mit Hilfe der Gerätesoftware Origin 7.0 von Microcal durchgeführt.

### 4.6.1 Proben für DSC-Messungen

Für die DSC-Messungen wurden die Proben in identischer Weise wie für die statischen Fluoreszenzexperimente vorbereitet. Nach der Durchführung der fünf Freeze-Thaw-Vortex-Zyklen wurde die jeweilige Probe mit einem Endvolumen von 1 mL für die kalorimetrischen Messungen verwendet.

### 4.6.2 Durchführung der Messungen

Nach dem Befüllen der Zellen wurden die Proben für 15 min äquiliibriert und im Anschluss 4 Up- und Down-Scans aufgenommen. Das Gerät wurde bei den Experimenten mit Lipiden im Low-Gain-Modus betrieben, bei der  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase im High-Gain-Modus. Die Heizrate betrug  $30\text{ }^\circ\text{C h}^{-1}$  bei allen Experimenten. Nach jedem Down-Scan wurde das System erneut 15 min äquiliibriert.

## 4.7 Aktivitätsmessungen an der Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase

Das Enzym Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase koppelt den Abbau von ATP mit dem gleichzeitigen Transport von Na<sup>+</sup> und K<sup>+</sup> gegen ihren elektrochemischen Gradienten. Dabei wird ATP zu ADP und P<sub>i</sub> umgesetzt, wodurch sich prinzipiell drei Möglichkeiten zur Bestimmung der Aktivität des Enzyms ergeben:

- 1) Messung der Abnahme der ATP-Konzentration.
- 2) Messung der Zunahme der ADP-Konzentration.
- 3) Messung der Zunahme der Konzentration an anorganischem Phosphat.

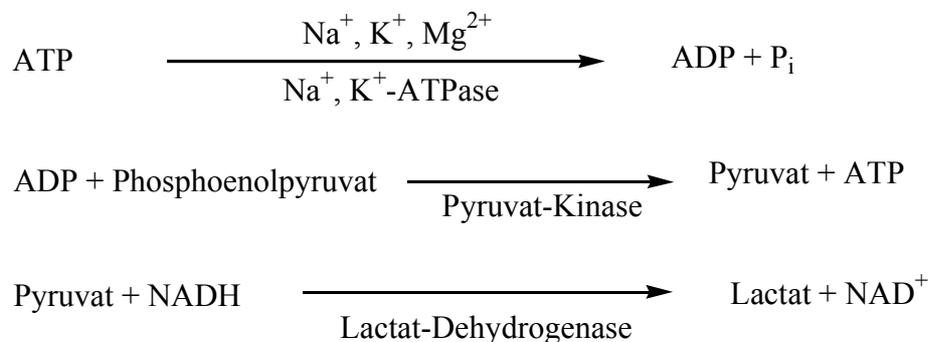
Experimentell relativ einfach durchzuführen ist die Aktivitätsbestimmung über das anorganische Phosphat. Die Probe wird eine bestimmte Zeit inkubiert und anschließend das Enzym durch Hitze inaktiviert. Die gebildete Menge an P<sub>i</sub> kann dann bestimmt und somit die Aktivität des Enzyms ermittelt werden. Ein Nachteil dieser Methode ist die fehlende Kontrolle über die Reaktion während der Inkubationszeit; z.B. werden zu geringe Konzentrationen an Substrat oder auch eine Inaktivierung des Enzyms erst nach der Phosphatbestimmung erkannt. Weiterhin ist diese Methode auch nur für temperaturabhängige Messungen geeignet. Aus diesen Gründen wurde ein System zur Aktivitätsbestimmung über die Fluoreszenz des NADH aufgebaut, durch das zum einen druckabhängige Messungen möglich sind und zum anderen Informationen über den aktuellen Zustand des Enzyms praktisch „online“ zugänglich sind. Die Einzelheiten der beiden Methoden werden im Folgenden näher dargestellt.

### Nachweis von anorganischem Phosphat

Die Bestimmung des Phosphats erfolgt als Molybdänblau. Aus einer sauren Lösung von Ammoniumheptamolybdat ((NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>) bildet sich bei Anwesenheit von Phosphationen die gelbe Phosphormolybdänsäure (H<sub>3</sub>P(Mo<sub>3</sub>O<sub>10</sub>)<sub>4</sub>). Diese wird anschließend mit einem geeigneten Reduktionsmittel (z.B. Ascorbinsäure) zu Molybdänblau umgesetzt. Unter Molybdänblau versteht man Molybdän-Mischoxide des sechs- bis fünfwertigen Molybdäns, die der allgemeinen Formel Mo<sub>3-x</sub>(OH)<sub>x</sub> entsprechen. Sie liegen in der Lösung in kolloidaler Form vor und können photometrisch durch Messung der Absorption bei 830 nm detektiert werden.

### Prinzip der Aktivitätsbestimmung durch das gekoppelte Enzym-Assay

Das Prinzip der Aktivitätsbestimmung der Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase über die Zunahme der ADP-Konzentration ist im folgenden Reaktionsschema dargestellt:



Das durch die Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase gebildete ADP reagiert mit Phosphoenolpyruvat bei Gegenwart der Pyruvat-Kinase zu Pyruvat und ATP. Im abschließenden Schritt wird das Pyruvat mit NADH durch die Lactat-Dehydrogenase zu Lactat und NAD<sup>+</sup> umgesetzt. Die Umsetzung des NADH zu NAD<sup>+</sup> kann fluoreszenzspektroskopisch durch die Abnahme der Fluoreszenzintensität bei 460 nm zeitabhängig verfolgt werden; ebenso ist die Messung über die Abnahme der Absorption bei 340 nm möglich.

#### 4.7.1 Nachweis von anorganischem Phosphat

Die Aktivität der Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase wurde bei 37 °C in einer Lösung aus 20 mM Hepes (pH 7,4, eingestellt mit Tris), 100 mM NaCl, 20 mM KCl, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, und 3 mM ATP mit und ohne 2 mM Ouabain bestimmt. Nach einer Inkubation von 30 min wurden die Proben zur Inaktivierung des Enzyms für 2 min in siedendes Wasser gegeben. Nach anschließender Zentrifugation wurde die Menge an gebildetem anorganischen Phosphat im Überstand nach FISKE und SUBBAROW bestimmt [Fiske 1925].

Die Proteinkonzentration wurde nach der Methode von LOWRY nach dem Präzipitieren durch kalte 10%-ige Trichloressigsäure bestimmt; als Standard diente unfraktioniertes BSA [Lowry 1951].

#### 4.7.2 Messung der Aktivität über das gekoppelte Enzym-Assay

Die Messung der Aktivität über die Abnahme der Fluoreszenz des NADH erfolgte in einer Lösung aus 100 mM NaCl, 20 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 3 mM Phosphoenolpyruvat, 150 μM NADH, 3 mM Tris-ATP, 48 μg Pyruvat-Kinase, 24 μg Lactat-Dehydrogenase und un-

terschiedlichen Mengen an Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase in einem 50 mM Imidazol-Puffer (pH 7,4). Das Gesamtvolumen der Lösung betrug 3 mL. Die Reaktion wurde durch Zugabe des ATP gestartet.

Die Lösung wurde anschließend in die Fluoreszenzküvette oder im Falle der druckabhängigen Messungen in das Quarzglasfläschchen gefüllt und blasenfrei verschlossen. Das Fläschchen wurde nun in die Hochdruckzelle gegeben und diese in das Spektrometer eingebaut und an das Drucksystem angeschlossen. Noch während des Druckaufbaus wurde mit der Messung der Intensität der NADH-Fluoreszenz bei 460 nm begonnen, die Anregungswellenlänge betrug 340 nm. Die Zeitspanne zwischen dem Starten der Reaktion durch die ATP-Zugabe und der Messung des ersten Datenpunktes betrug bei den Druckexperimenten ~ 2 min.

### 4.7.3 Solubilisierung

Zur Solubilisierung der Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase wurde das Enzym mit dem Detergens C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> gemischt. Auf 1 mg Enzym kam dabei 1 mg C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> bei einer Konzentration an Enzym von 1 mg mL<sup>-1</sup>. Dazu wurde eine Lösung des Enzyms bei 4 °C mit der entsprechenden Menge an C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> versetzt und im Anschluss für 60 min bei 100000 g zentrifugiert. Der Überstand enthält das aktive solubilierte Enzym.

### 4.7.4 Rekonstitution

Für eine erfolgreiche Rekonstitution sind die Mengen an eingesetztem Detergens ganz entscheidend. Ein erster Test wurde mit dem Lipid DMPC durchgeführt. Zur Bestimmung der optimalen Menge an C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> zur Mizellarisierung des Lipids wurden 2 mg Lipid mit LAURDAN auf dem für die Fluoreszenzspektroskopie üblichen Weg präpariert und nach der Vesikelbildung unterschiedliche Mengen an C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> zugegeben. Die GP-Werte dieser Mischung wurden temperaturabhängig aufgenommen.

Zur Rekonstitution wurden 2 mg DMPC mit LAURDAN zusammen mit 5 mg C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> in 500 µL H<sub>2</sub>O gelöst und 4,7 mL der solubilierten Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase zugegeben. Die maximale Konzentration an Enzym im DMPC beträgt daher bei vollständigem Einbau 1 mol%. Durch die Zugabe von 1 g BioBeads wird die Konzentration an C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> unter den Wert der CMC erniedrigt und es kommt zur Vesikelbildung des Lipids mit dem Enzym. Nach der Entfernung der BioBeads durch Zentrifugation wurde der GP-Wert der Vesikel aus DMPC und Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase temperaturabhängig vermessen.

## 5 Ergebnisse und Diskussion

### 5.1 Das binäre System DMPC/DSPC

Biologische Membranen sind auf Grund der vielen unterschiedlichen Zusammensetzungen und Komponenten sehr komplexe Systeme. Zum besseren Verständnis der Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Lipiden wurden eine Vielzahl von Untersuchungen an Einkomponentensystemen durchgeführt, die jedoch kein realistisches Modell für die Simulation einer biologischen Membran darstellen. Ein wichtiger Aspekt dabei ist das Fehlen von ausgeprägten Phasenkoexistenzen unterschiedlicher Lipidphasen. Das Zweikomponentensystem aus den beiden Phospholipiden DMPC und DSPC stellt einen ersten Schritt in Richtung eines Modellsystems dar, mit dem verschiedene Aspekte von biologischen Membranen untersucht werden können [Glis 1998, Sugar 1999, Nielsen 2000]. Dabei muss nach wie vor berücksichtigt werden, dass wir von einem vollständigen Verständnis der komplexen Vorgänge noch sehr weit entfernt sind. Jedoch ist es das Ziel der Experimente an Modellbiomenbranen, ganz bestimmte Aspekte der Wechselwirkungen zwischen den Membrankomponenten zu untersuchen und somit nach und nach kleine Steine des Puzzles zusammen zu fügen.

DMPC und DSPC unterscheiden sich in der Länge der Kohlenwasserstoffketten der Fettsäuremoleküle. Dies führt zu einem „hydrophobic mismatch“ zwischen den beiden Lipiden und dadurch zu einer Abweichung vom idealen Mischungsverhalten [Landwehr 1994, Winter 1999]. Das  $T, x$ -Phasendiagramm des binären Systems aus DMPC und DSPC ist in Abbildung 5.1 dargestellt.

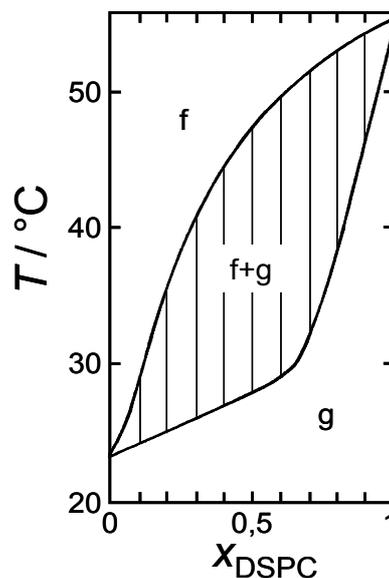
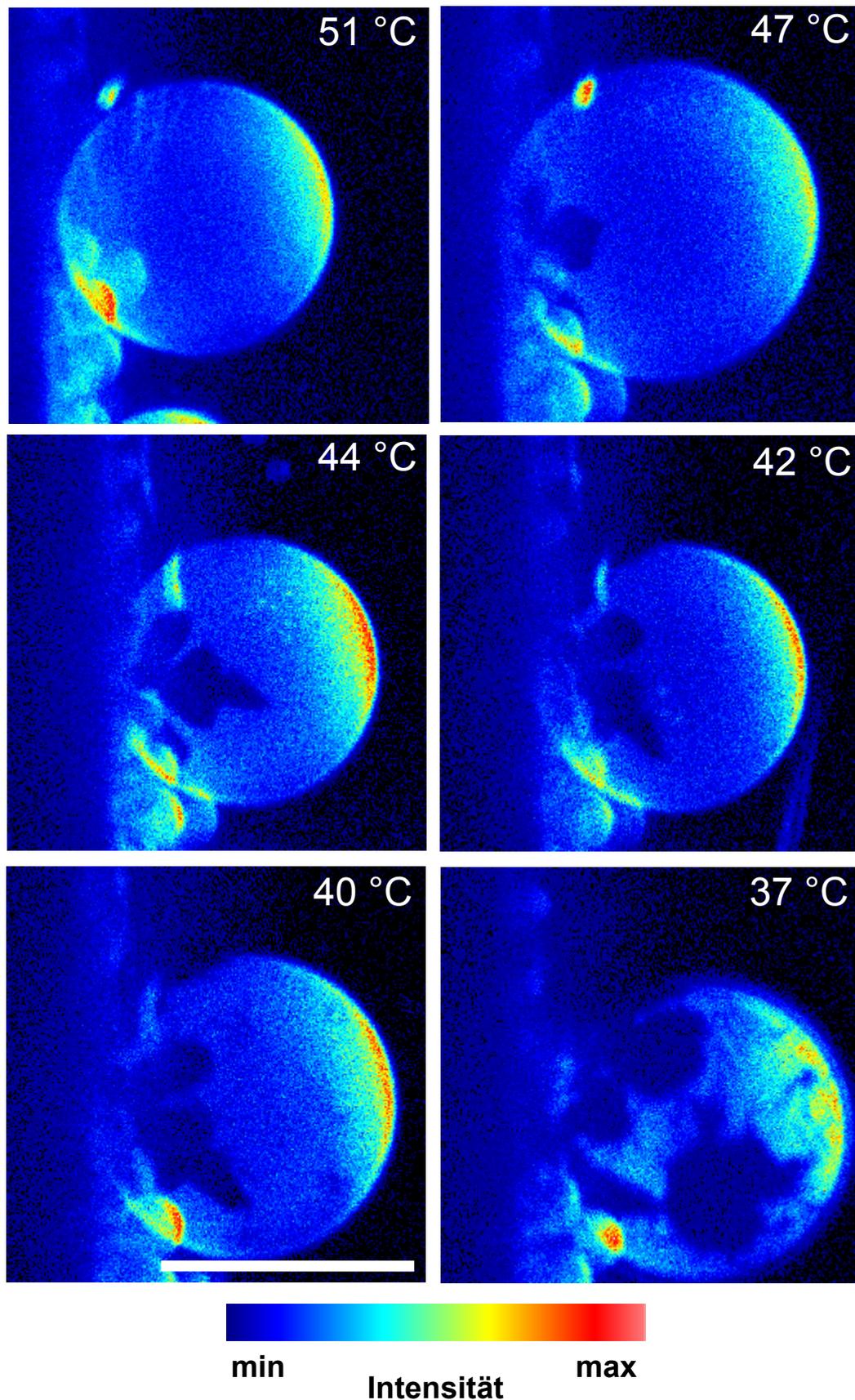


Abbildung 5.1  $T, x$ -Phasendiagramm von DMPC/DSPC [Winter 1999]. g: Gelphase, f: fluide Phase.

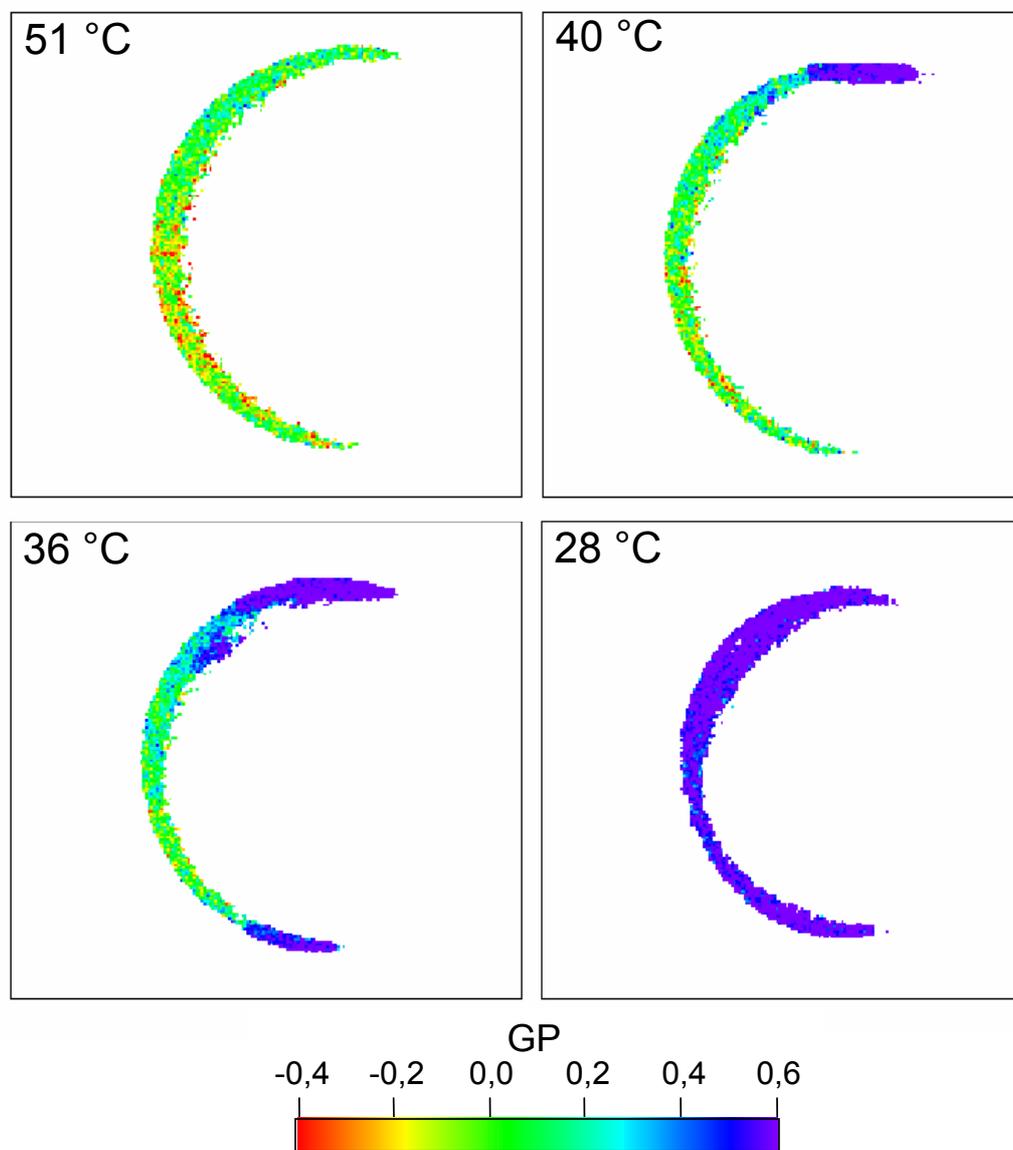
Für das reine DMPC liegt die Hauptphasenübergangstemperatur bei 24 °C, für reines DSPC bei 55 °C. Das Phasendiagramm zeigt die vollständige Mischbarkeit der beiden Lipide bei hohen Temperaturen in der flüssigkristallinen Phase und bei tiefen Temperaturen in der Gelphase. Der Gel-Fluid-Koexistenzbereich liegt für eine äquimolare Mischung der Lipide zwischen ~ 29 °C und 49 °C; die Deuterierung einer der Lipidkomponenten führt zu einer Reduzierung beider Temperaturen um ~ 4 °C. Das Phasendiagramm stimmt sehr gut mit anderen experimentellen und theoretischen Daten überein [Mabrey 1976, Sankaram 1992, Morrow 1991, Jørgensen 1995, Leidy 2001].

Der Bereich der Phasenkoexistenz ist sehr wichtig für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen. Messungen mit der Methode der „Fluorescence Recovery after Photobleaching“ haben die Existenz von sehr heterogenen Gel-Domänen und fluiden Domänen aufgezeigt [Bultmann 1991]. Monte Carlo Computersimulationen von Phasendiagrammen ergaben langlebige percolationsartige Domänen mit einem Netzwerk aus Grenzflächenregionen, wobei sich deren Eigenschaften deutlich von denen der reinen koexistierenden Phasen unterscheiden [Jørgensen 1993, Jørgensen 1995]. Eine Untersuchung mit Hilfe der Methode der Kleinwinkel-Neutronenstreuung ergab das Vorhandensein von Domänen im Zweiphasengebiet mit einer ausgedehnten Oberflächenfraktalstruktur [Czeslik 1997, Winter 1999]. Diese Ergebnisse haben eine Reihe von weiteren unerwarteten Eigenschaften der beiden Lipidphasen ausgezeigt. Entgegen den Erwartungen tritt der Prozess der Phasenseparation nicht unabhängig in jeder Lipiddoppelschicht auf, sondern es kommt zur Bildung von großen Domänen über viele Doppelschichten hinweg. Zusätzlich variieren auch die Menge und die Zusammensetzung der beiden Phasen stark von den Werten, die dem Gleichgewichtsphasendiagramm entnommen werden können. Diese Daten sind ein Beweis dafür, dass die Phasenseparation in multilamellaren Membranen durch langlebige Nichtgleichgewichtsstrukturen dominiert wird. Diese Strukturen haben verzweigte Grenzlinien und deren Bildung wird durch interlamellare Wechselwirkungen mit bestimmt. Die Fluoreszenzmikroskopie wurde verwendet, um die laterale Organisation der Lipide direkt sichtbar zu machen. Im Mikrometerbereich können so Informationen über die Form von Lipid-Domänen und über den Phasenzustand der Lipide gewonnen werden. Ausgewählte Bilder von GUV aus DMPC/DSPC 1:1 (mol/mol) mit dem Fluorophor *N*-Rh-DPPE bei verschiedenen Temperaturen sind in Abbildung 5.2 dargestellt. In der flüssigkristallinen Phase bei hohen Temperaturen ist der Fluorophor homogen in der Lipiddoppelschicht verteilt und die Oberfläche des Vesikels zeigt eine homogene Fluoreszenz. Durch das Absenken der Temperatur in das Zweiphasengebiet werden die Lipid-Domänen als nicht fluoreszierende dunkle Bereiche auf der Vesikeloberfläche sichtbar.

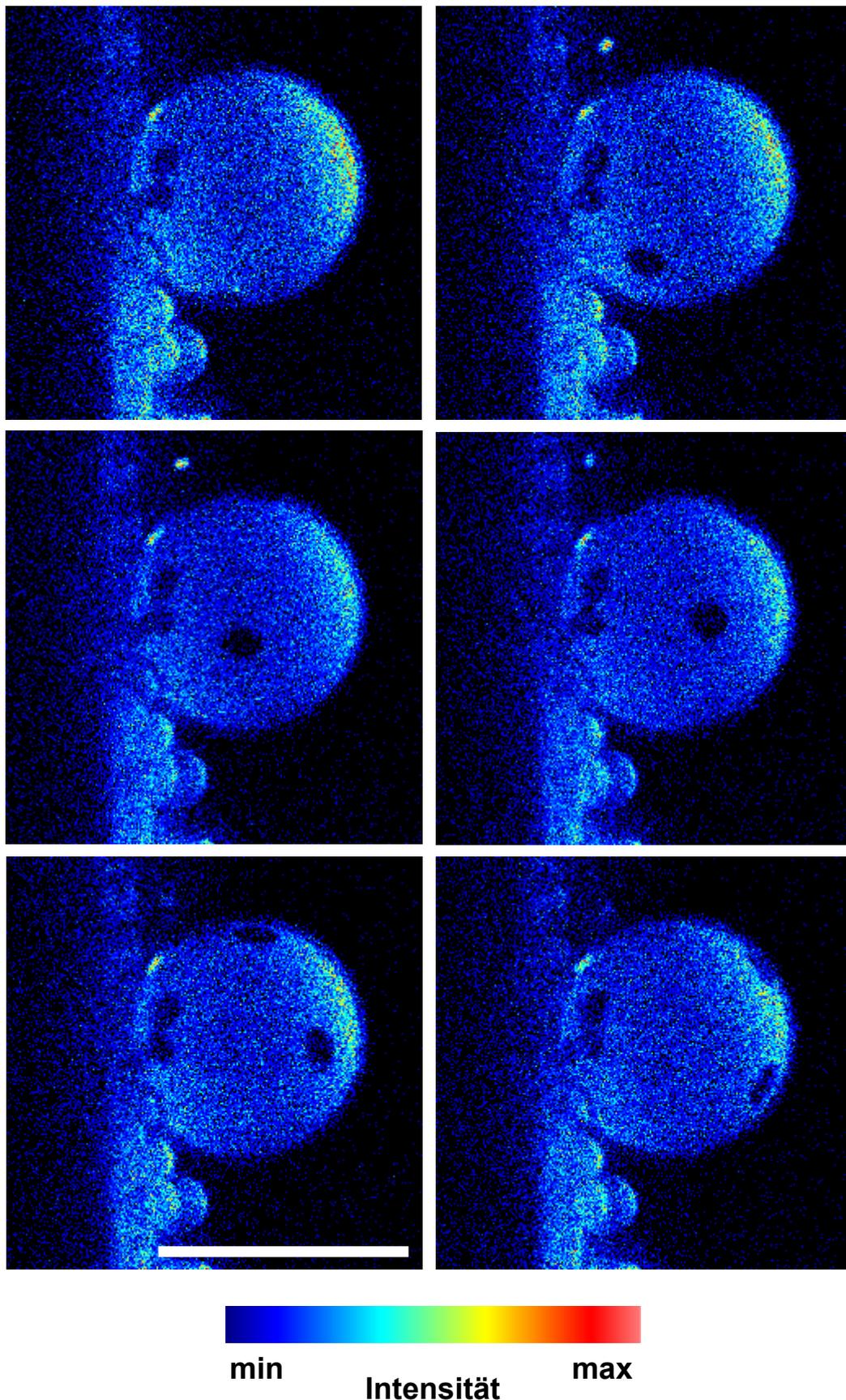


**Abbildung 5.2** Fluoreszenzbilder (in Falschfarben-Darstellung) der Probe DMPC/DSPC (1:1) mit 1 mol% *N*-Rh-DPPE. Der Balken entspricht 25 μm. Die Bilder zeigen die Vesikeloberfläche.

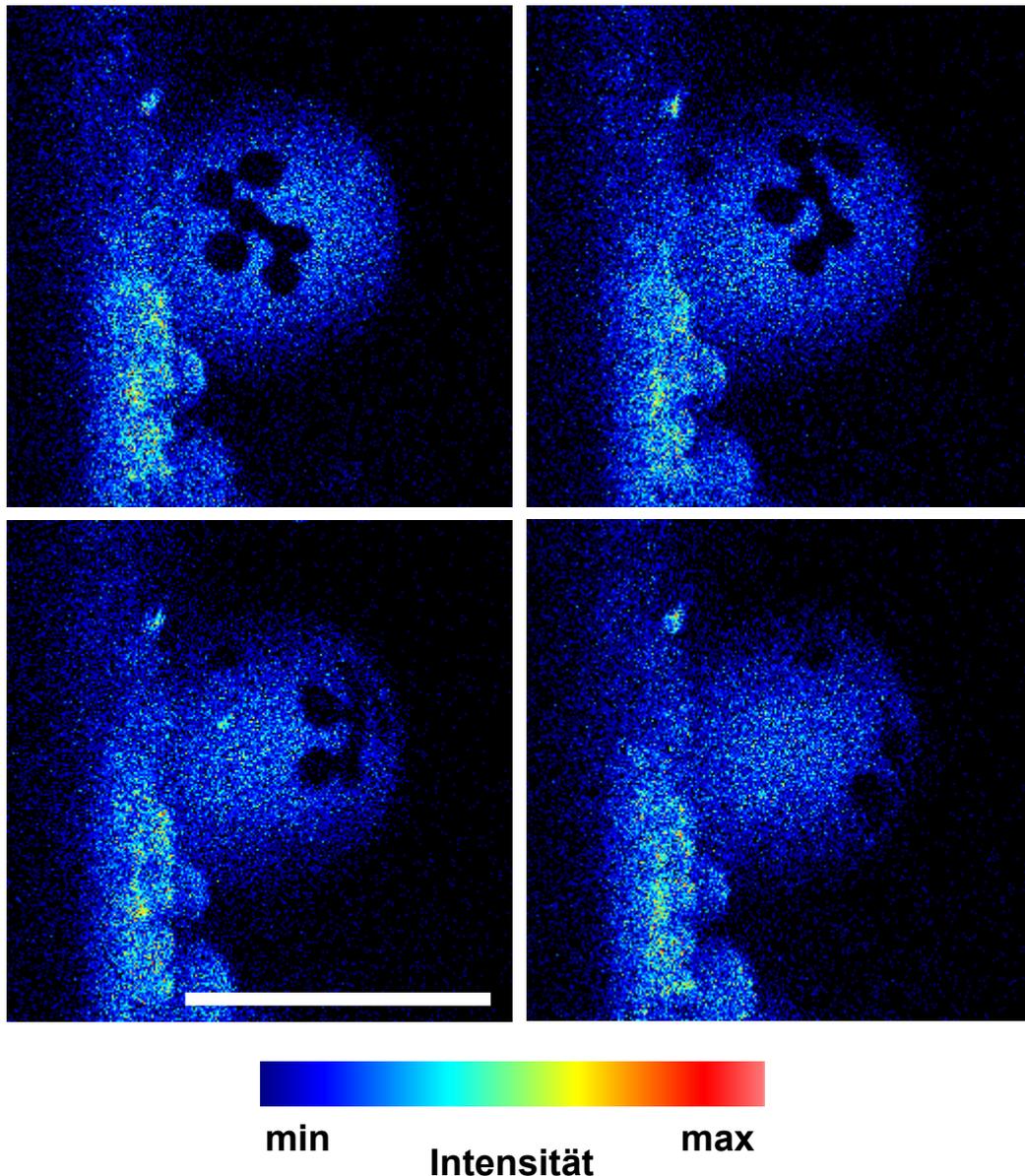
Diese gelartigen Domänen wandern über die Oberfläche und breiten sich mit sinkender Temperatur weiter aus. Dabei durchspannen sie auf Grund einer starken Kopplung zwischen den beiden Membranschichten den inneren und äußeren Monolayer der Lipiddoppelschicht. In den Abbildungen 5.4 und 5.5 sind die Bewegungen der Domänen auf der Vesikeloberfläche durch die zeitabhängige Aufnahme von Bildern verdeutlicht. Der zeitliche Abstand zwischen den Bildern beträgt  $\sim 10$  s. Unterhalb einer Temperatur von  $30$  °C verschwinden die nicht fluoreszierenden Regionen wieder und die Oberfläche der Vesikel erscheint wieder homogen. Die GP-Bilder der Vesikel aus DMPC/DSPC mit LAURDAN bei vier verschiedenen Temperaturen sind in der Abbildung 5.3 dargestellt.



**Abbildung 5.3** GP-Bilder der Probe aus DMPC/DSPC (1:1) mit 2 mol% LAURDAN. Die Bilder zeigen einen Schnitt durch das Vesikel.



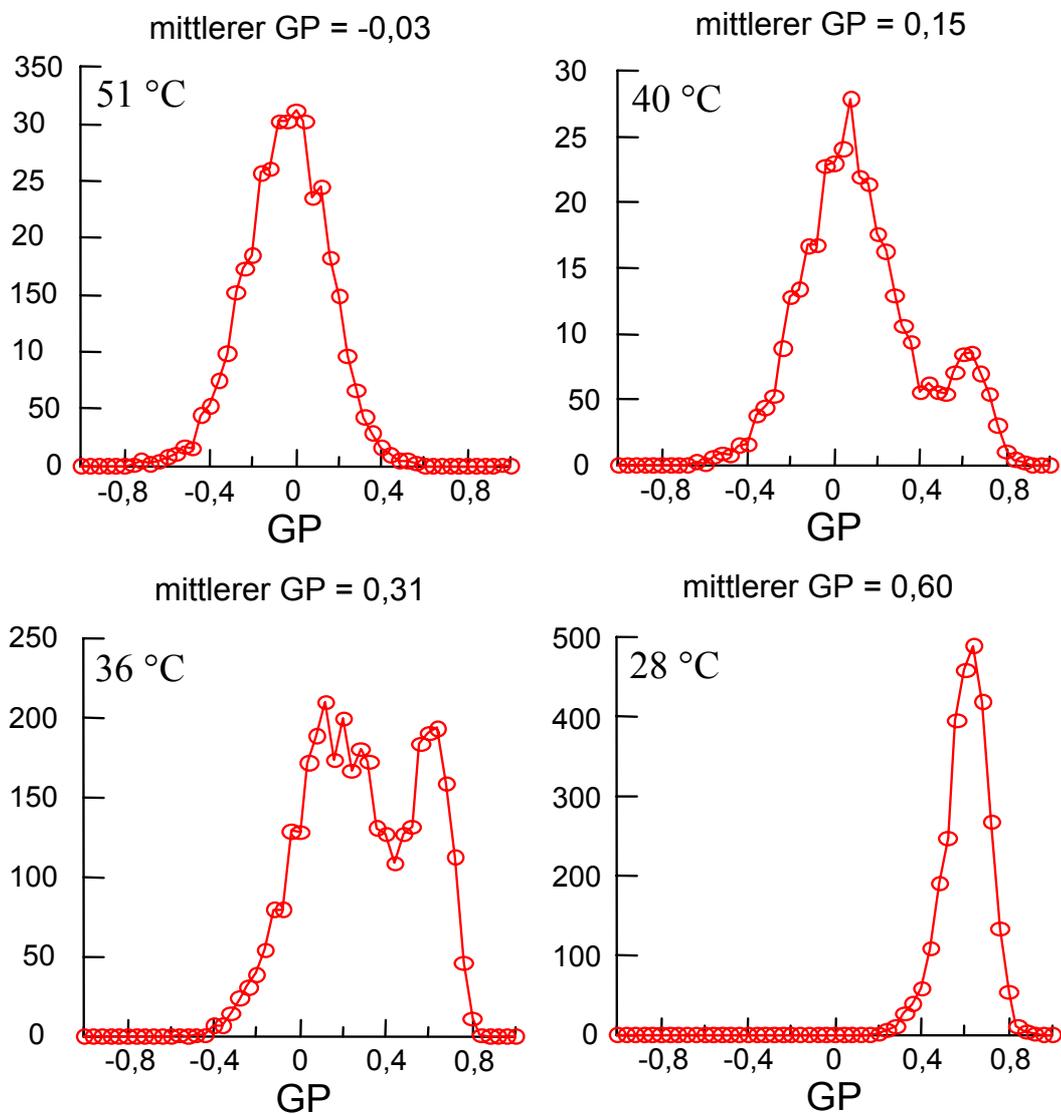
**Abbildung 5.4** Fluoreszenzbilder (in Falschfarben-Darstellung) der Probe DMPC/DSPC (1:1) mit 1 mol% *N*-Rh-DPPE als Funktion der Zeit bei  $T = 46$  °C. Zwischen den einzelnen Bildern liegen  $\sim 10$  s. Der Balken entspricht 20  $\mu\text{m}$ .



**Abbildung 5.5** Fluoreszenzbilder (in Falschfarben-Darstellung) der Probe DMPC/DSPC (1:1) mit 1 mol% *N*-Rh-DPPE als Funktion der Zeit bei  $T = 41$  °C. Zwischen den einzelnen Bildern liegen  $\sim 10$  s. Der Balken entspricht 20  $\mu\text{m}$ .

Aus den Daten der zeitabhängig aufgenommenen Mikroskopiebilder eines Vesikels kann die Wanderungsgeschwindigkeit der Domänen abgeschätzt werden. Dazu werden die Positionen einer Domäne auf der Oberfläche des Vesikels in verschiedenen Frames bestimmt; mit Hilfe der Zeitabstände zwischen den einzelnen Frames kann so die ungefähre Wanderungsgeschwindigkeit berechnet werden. Für die Probe DMPC/DSPC (1:1) mit 1 mol% *N*-Rh-DPPE erhält man für einen Vesikeldurchmesser von  $\sim 20$   $\mu\text{m}$ , einer Bewegung von  $\sim 2,5$   $\mu\text{m}$  der Domäne zwischen den Frames und einer Zeitdifferenz zwischen den Frames von 5,31 s eine Wanderungsgeschwindigkeit von  $\sim 0,5$   $\mu\text{m s}^{-1}$ .

In der fluiden Phase bei  $T > 50\text{ °C}$  ist eine homogene Verteilung der GP-Werte mit einem GP-Wert von annähernd  $-0,1$  zu erkennen. Das zugehörige Histogramm in der Abbildung 5.6 zeigt deutlich nur ein Maximum mit einem mittleren GP-Wert von  $-0,03$ . Durch Eintritt in das Zweiphasengebiet wird eine Separation von Bereichen mit sehr stark unterschiedlichen GP-Werten von  $-0,1$  und  $0,5$  sichtbar. Diese Werte sind typisch für LAURDAN in der flüssigkristallinen Phase und in der Gelphase. Die entsprechenden Histogramme sind bimodal und zeigen als Maxima die GP-Werte der reinen Phasen. Bei Temperaturen unterhalb des Zweiphasengebietes ist das GP-Bild wieder homogen und das Histogramm zeigt ein Maximum bei einem mittleren GP-Wert von  $\sim 0,6$ , ein Wert, der typisch ist für eine reine Gelphase.

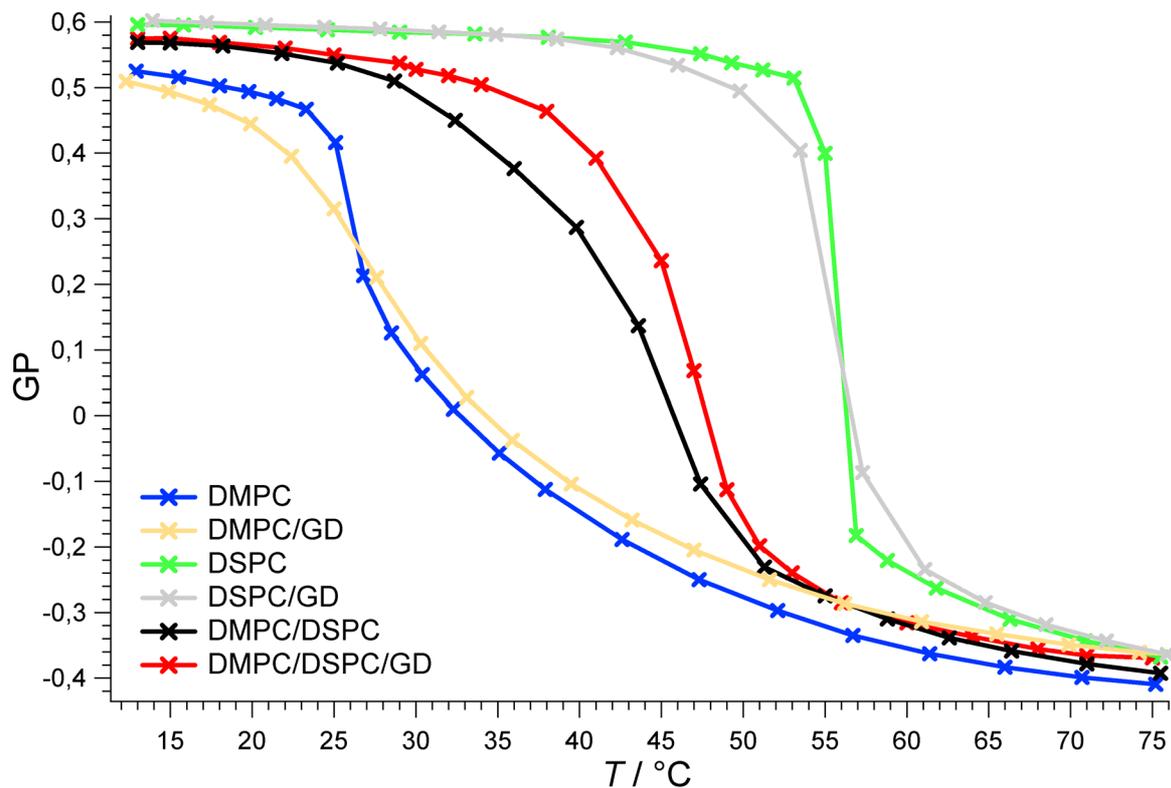


**Abbildung 5.6** Histogramme der GP-Bilder der Probe DMPC/DSPC (1:1) mit LAURDAN als Fluorophor.

## 5.2 DMPC/DSPC/Gramicidin

### 5.2.1 Fluoreszenzspektroskopie

Der Einfluss von GD auf das Phasenverhalten der Lipide wird in den Ergebnissen aus den fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen deutlich, die in der Abbildung 5.7 dargestellt sind. Die Abbildung zeigt die GP-Werte der reinen Lipide DMPC und DSPC mit und ohne GD, sowie für die Mischung aus DMPC/DSPC mit dem Polypeptid und ohne.

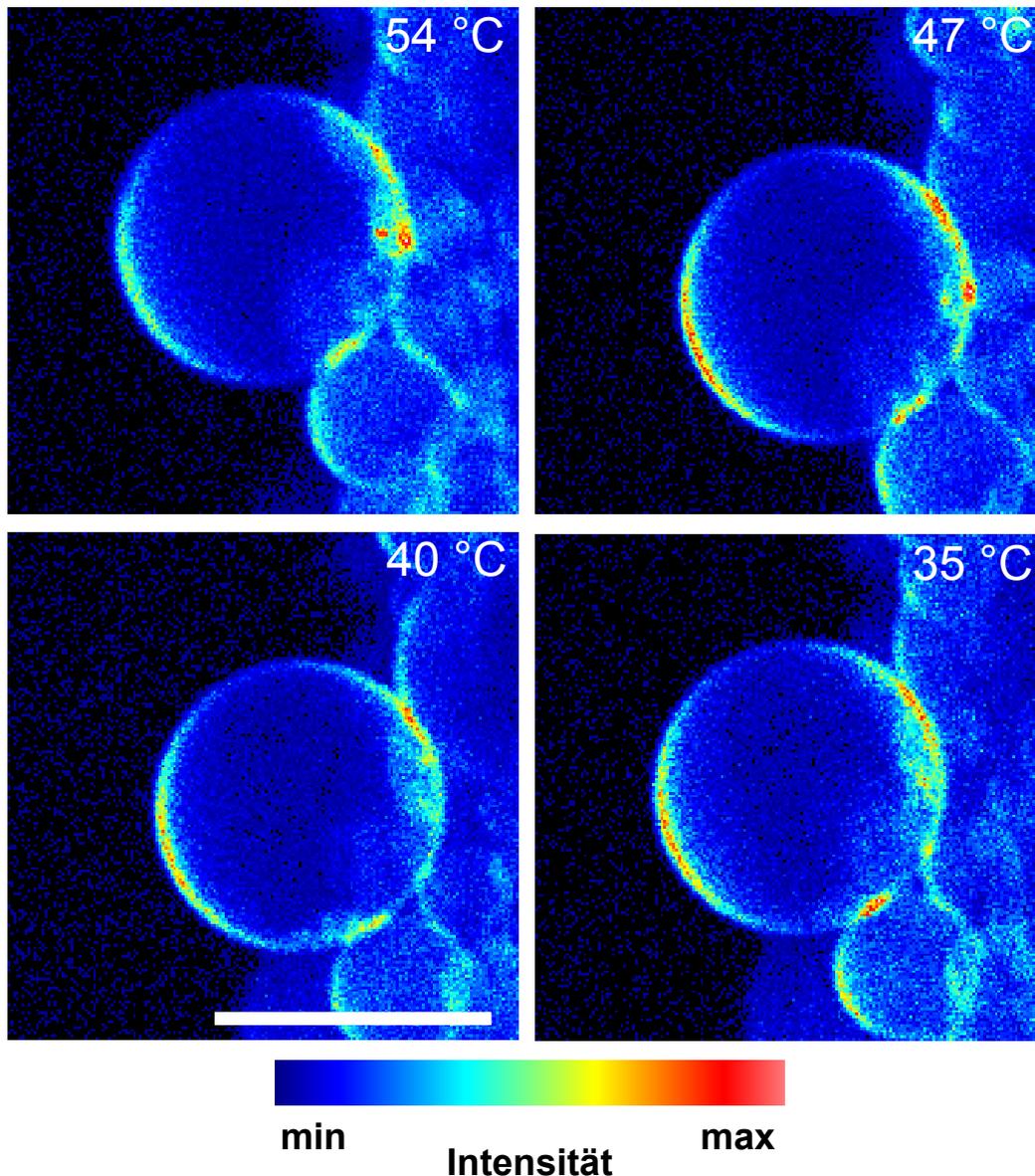


**Abbildung 5.7** GP-Werte verschiedener Lipide und Lipidmischungen mit und ohne Gramicidin (5 mol%) als Funktion der Temperatur.

Gramicidin bewirkt beim DMPC und DSPC eine deutliche Verbreiterung des gel/fluid-Phasenüberganges sowie Veränderungen in der Ordnung der Lipidketten, wie es auch in anderen Untersuchungen gefunden wurde. Dies lässt sich durch eine Verringerung des „Hydrophobic Mismatch“ zwischen dem Peptid und dem Lipid durch eine Anpassung der hydrophoben Dicke der Lipide erklären. Anders dagegen verhält sich das GD im System DMPC/DSPC. Ohne Polypeptid ist deutlich das Phasenkoexistenzgebiet zwischen  $\sim 28$  und  $\sim 48$  °C durch eine kontinuierliche Abnahme des GP-Wertes erkennbar. Durch den Einbau von GD kommt es zu einer eher sprunghaften Änderung des GP-Wertes bei einer Temperatur, die der Mitte des Zweiphasengebietes der Mischung entspricht.

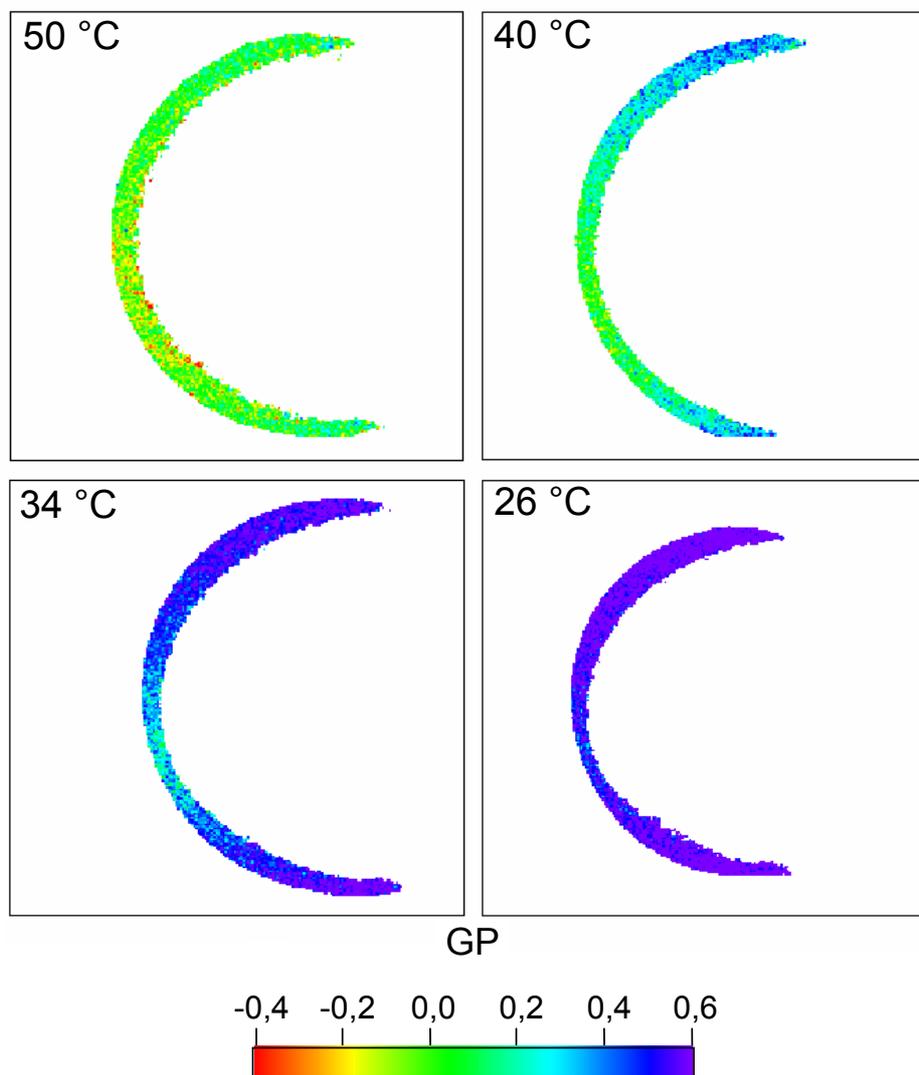
### 5.2.2 Fluoreszenzmikroskopie

Bilder der Lipidmischung mit 5 mol% Gramicidin und *N*-Rh-DPPE als Fluorophor sind in der Abbildung 5.8 gezeigt. Bei hohen Temperaturen sind die Fluorophormoleküle wie im Falle der Probe ohne Gramicidin homogen in der Lipiddoppelschicht verteilt. Mit sinkender Temperatur werden diesmal aber keine nicht fluoreszierenden dunklen Bereiche sichtbar. Dies bedeutet, dass keine signifikante Domänenkoexistenz in der Größenordnung von Mikrometern mehr vorhanden ist.

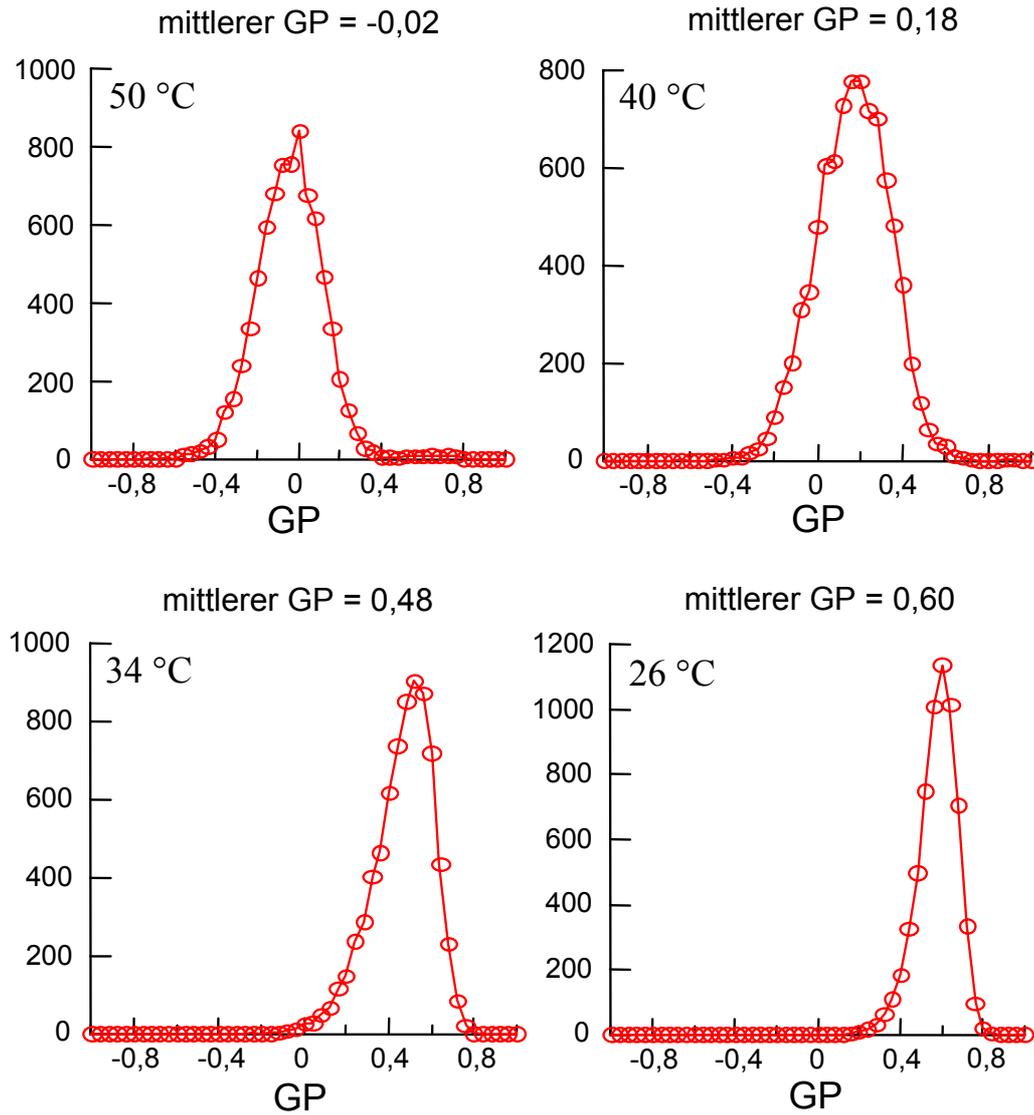


**Abbildung 5.8** Fluoreszenzbilder (in Falschfarben-Darstellung) der Probe DMPC/DSPC (1:1) 5 mol% GD mit 1 mol% *N*-Rh-DPPE. Der Balken entspricht 20  $\mu\text{m}$ . Die Bilder zeigen die Vesikeloberfläche.

Die dazugehörigen GP-Bilder und die Histogramme sind in den Abbildungen 5.9 und 5.10 dargestellt. Die Bilder zugehörig zur fluiden Phase zeigen keinen Unterschied im Vergleich zur Lipidmischung ohne GD. Das Absenken der Temperatur führt zu einer kontinuierlichen Änderung des GP-Wertes ohne die Ausbildung von Regionen mit stark unterschiedlichen GP-Werten. Die Histogramme sind über den gesamten Temperaturbereich unimodal. Diese Daten zeigen eindeutig, dass der Einbau von Gramicidin zu drastischen Änderungen der Domänenstruktur bzw. den Konzentrationsfluktuationen (zumindest im Mikrometerbereich) führt.



**Abbildung 5.9** GP-Bilder der Probe aus DMPC/DSPC (1:1) 5 mol% GD mit 2 mol% LAURDAN. Die Bilder zeigen einen Schnitt durch das Vesikel.



**Abbildung 5.10** Histogramme der GP-Bilder der Probe DMPC/DSPC (1:1) 5 mol% GD mit LAURDAN als Fluorophor.

### 5.2.3 Diskussion

Der Einbau von Gramicidin hat einen signifikanten Einfluss auf die Struktur der Lipiddoppelschicht und auf ihr temperaturabhängiges Phasenverhalten. Auf der anderen Seite hat jedoch auch die Lipidmatrix Einfluss auf die Konformation des Polypeptids, wie IR-spektroskopische Untersuchungen zeigen konnten. Das Gleichgewicht zwischen doppelhelikalen Strukturen und den helikalen Dimeren des GD ist dabei von der Länge der Kohlenwasserstoffketten der Phospholipide und ihrem Phasenzustand abhängig.

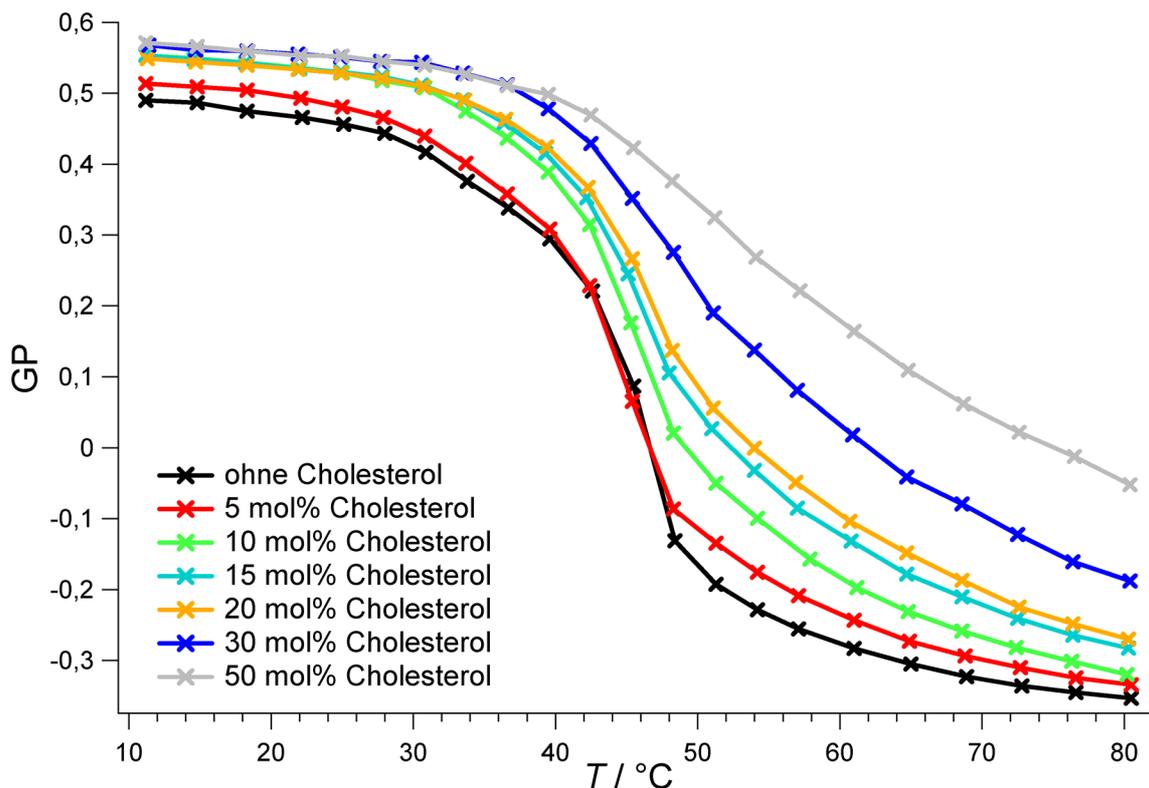
Durch den Einbau des GD kommt es zu einer drastischen Abnahme der Konzentrationsfluktuationen und der Domänengröße in einem Größenbereich von Nano- bis Mikrometern im Bereich des Gel-Fluid-Phasenkoexistenzgebietes. Im Nanometerbereich zeigt sich dies in den Ergebnissen aus den Untersuchungen mit Hilfe der Kleinwinkelneutronenstreuung [Fahsel 2002]. Schon der Einbau von 2 mol% GD führt zu einer Reduzierung der Konzentrationsfluktuationen um 50%. Diese Abnahme wird begleitet durch eine Zunahme der unteren Grenze der Korrelationslänge ( $\xi > 240 \text{ \AA}$  für DMPC/DSPC,  $\xi > 370 \text{ \AA}$  für DMPC/DSPC/2 mol% GD), wobei die Reduzierung der Fluktuationen oberhalb von  $\sim 1000 \text{ \AA}$  stärker ausgeprägt ist. Im Mikrometerbereich wird dies in den Ergebnissen der Fluoreszenzmikroskopie deutlich, in der das Gramicidin die Ausbildung der nicht fluoreszierenden Bereiche und damit die Bildung der Gel-Domänen verhindert. Dieses Ergebnis wird durch die Ergebnisse der GP-Bilder in der Mikroskopie sowie der GP-Werte in der Fluoreszenzspektroskopie bestätigt. Die Histogramme sind im Falle der Lipidmatrix ohne GD im Zweiphasengebiet bimodal, wo hingegen mit GD über den gesamten Temperaturbereich nur ein Maximum zu beobachten ist. Im Bereich der mittleren Temperatur des Zweiphasengebietes kommt es zu einer eher sprunghaften Änderung des mittleren GP-Wertes sowohl in der Fluoreszenzmikroskopie als auch in den Ergebnissen der Spektroskopie.

Diese Ergebnisse lassen sich durch einen molekularen Sortierungsmechanismus und Absorptionsphänomene an den Grenzflächen von GD erklären, z.B. die selektive Anreicherung einer Lipidsorte (hier das DMPC) in der Umgebung des Polypeptids auf Grund eines geringeren „hydrophobic mismatch“ [Harroun 1999a, 1999b]. Die Konsequenz daraus wäre eine Veränderung der Größenverteilung der Domänen im Phasenkoexistenzgebiet der Lipiddoppelschicht, die in den durchgeführten Experimenten deutlich erkennbar ist.

## 5.3 DMPC/DSPC/Cholesterol

### 5.3.1 Fluoreszenzspektroskopie

In Abbildung 5.11 sind die GP-Werte der äquimolaren Mischung aus DMPC/DSPC mit verschiedenen Konzentrationen an Cholesterol als Funktion der Temperatur dargestellt. Der Zusatz des Cholesterols führt zu einer Zunahme der GP-Werte sowohl in der Gel- als auch in der fluiden Phase, wobei der Einfluss auf die fluide Phase jedoch deutlich stärker ausgeprägt ist.

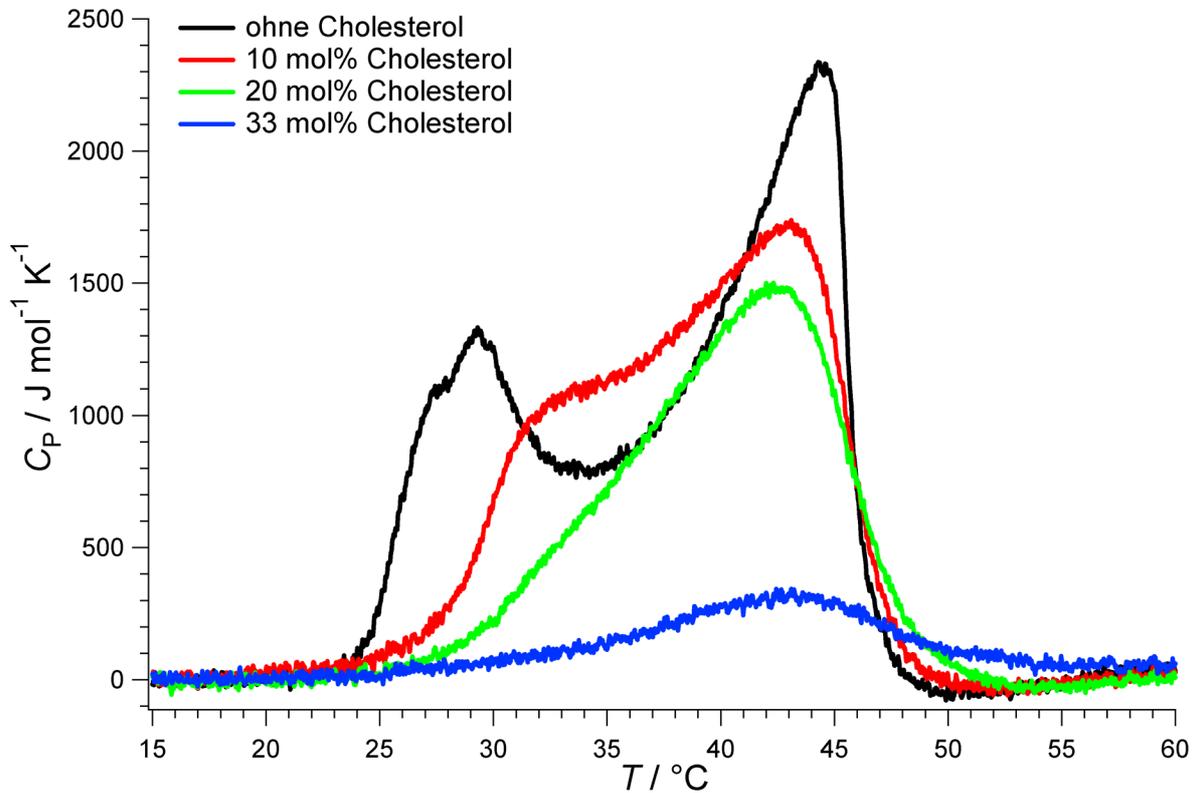


**Abbildung 5.11** GP-Werte verschiedener DMPC/DSPC-Proben mit unterschiedlichen Konzentrationen an Cholesterol als Funktion der Temperatur.

In der Gelphase ist die Erhöhung der GP-Werte auf eine verringerte Polarität der Fluorophorumgebung durch das Cholesterol zurückzuführen. Dabei zeigt sich ab einer Konzentration von  $\sim 30$  mol% in der Gelphase ein Sättigungsverhalten, d.h. eine weitere Erhöhung der Konzentration führt zu keiner weiteren GP-Wert-Erhöhung. Eine Cholesterol-Konzentration von 5 mol% hat einen nur sehr geringen Einfluss auf den Verlauf der GP-Werte im Vergleich zur Probe des reinen Lipidgemisches. Bei Konzentrationen  $> 5$  mol% und besonders im Bereich zwischen 20 mol% und 30 mol% kommt es zu einem immer geringer werdenden Abfall der GP-Werte mit steigender Temperatur. Ab einer Konzentration von 30 mol% Cholesterol ist ein Phasenübergang kaum noch zu erkennen.

### 5.3.2 DSC-Messungen

Abbildung 5.12 zeigt die DSC-Thermogramme des binären Lipidsystems DMPC/DSPC und des ternären Systems mit Cholesterol bei drei verschiedenen Cholesterol-Konzentrationen.



**Abbildung 5.12** Basislinienkorrigierte DSC-Thermogramme von DMPC/DSPC mit verschiedenen Konzentrationen an Cholesterol.

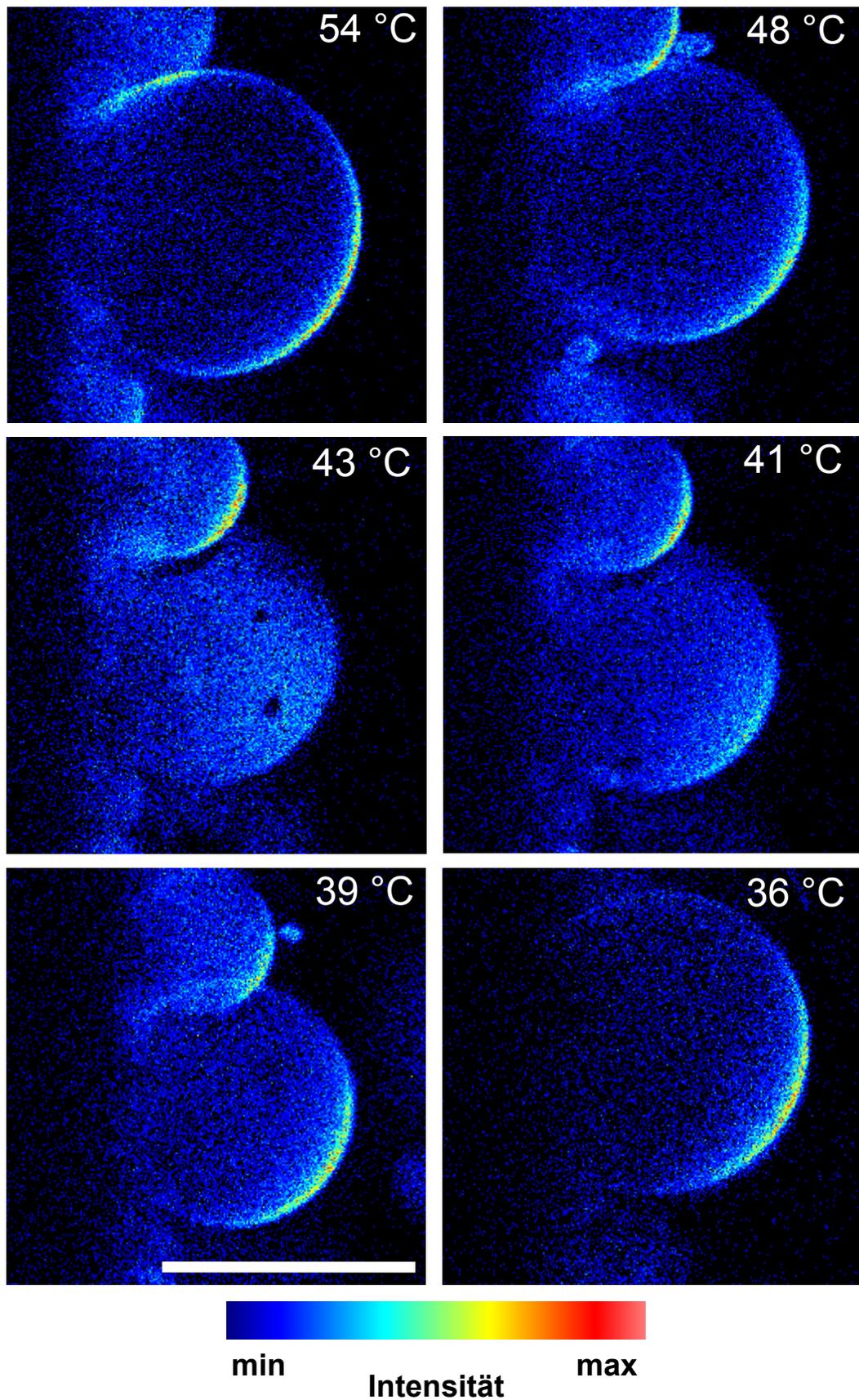
In der Probe ohne Cholesterol sind deutlich zwei Peaks mit den Maxima bei  $\sim 29\text{ °C}$  und  $46\text{ °C}$  zu erkennen, die dem Schmelzen DMPC-reicher Regionen ( $29\text{ °C}$ ) und dem Schmelzen DSPC-reicher Regionen ( $46\text{ °C}$ ) zugeordnet werden können. Die gesamte Umwandlungsenthalpie der Probe wurde zu  $\Delta H_U = 20\text{ kJ mol}^{-1}$  Lipidmischung bestimmt. Die Zugabe von Cholesterol führt zu einer Verschiebung des Maximums des ersten Peaks zu höheren Temperaturen, das zweite Maximum bleibt in seiner Lage nahezu unverändert. Dabei kommt es neben der Verschiebung auch zu einer starken Abnahme des Beitrages des ersten Peaks zur Enthalpie der Umwandlung. Die Umwandlungsenthalpie wird durch die zunehmende Konzentration an Cholesterol sehr gering. Ab einer Konzentration von 33 mol% Cholesterol kann ein Phasenübergang kaum noch detektiert werden.

### 5.3.3 Fluoreszenzmikroskopie

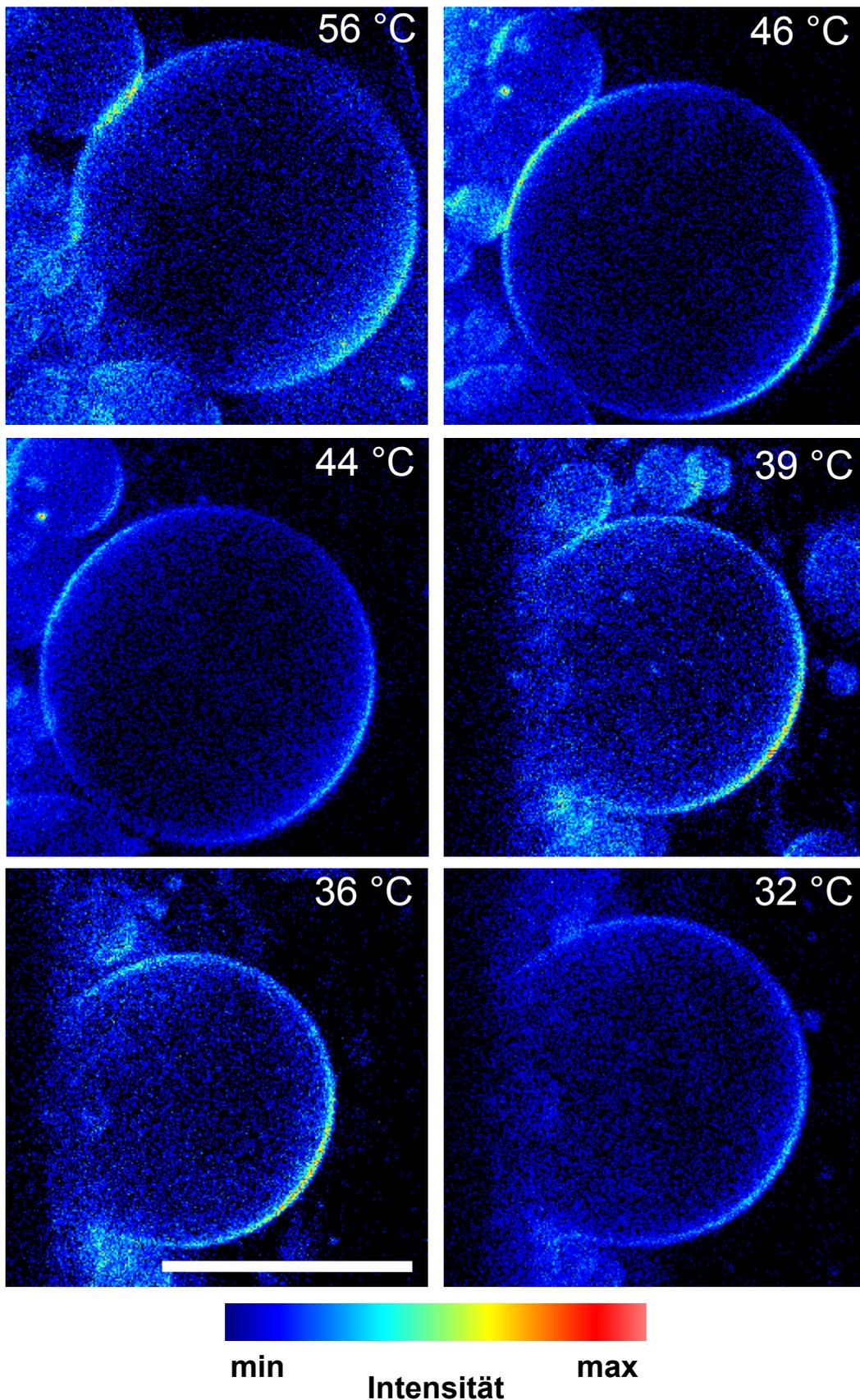
Cholesterol wurde bis zu einer maximalen Konzentration von 33 mol% in das System DMPC/DSPC 1:1 (mol/mol) eingebaut. Die Bilder der Messung mit dem Fluorophor *N*-Rh-DPPE und einer Cholesterolkonzentration von 10 mol% sind in Abbildung 5.13 dargestellt. Bei hohen Temperaturen, d.h. in der fluiden Phase, zeigt sich eine homogene Verteilung des Fluorophors in der Lipidmischung. Abkühlen der Probe führt zur Ausbildung von sehr kleinen nicht fluoreszierenden Bereichen innerhalb eines nur sehr schmalen Temperaturbereichs, deutlich sichtbar nur im Bild bei der Temperatur 43 °C. Bei tieferen Temperaturen ist die Fluoreszenz der Vesikeloberfläche wieder homogen.

Der Einbau von 20 mol% Cholesterol führt ebenfalls zu einer homogenen Verteilung in der fluiden Phase bei höheren Temperaturen, jedoch bilden sich diesmal keine nicht fluoreszierenden Bereiche über den gesamten Temperaturbereich. Im Mikrometerbereich bildet sich also keine signifikante gel/fluid-Phasenkoexistenz wie im Falle des reinen Lipidgemisches aus. Die Probe mit 33 mol% Cholesterol zeigt ein identisches Verhalten.

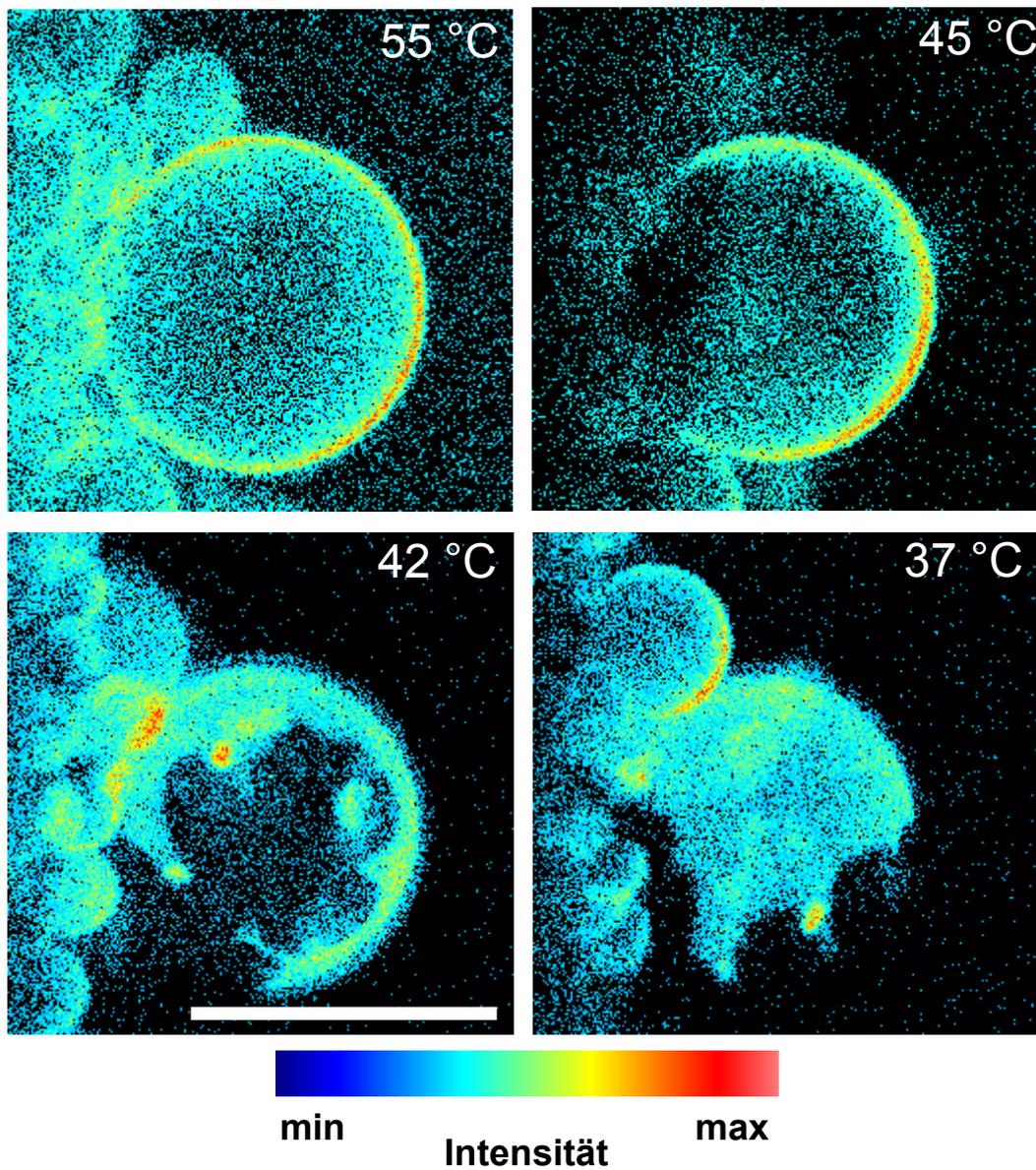
In der Abbildung 5.14 sind die Bilder der Probe bestehend aus 3 mol% BODIPY-Cholesterol und dem Lipidsystem DMPC/DSPC dargestellt. Im Bereich des Zweiphasengebietes sind deutlich dunkle nicht fluoreszierende Bereiche ähnlich denen im reinen Lipidsystem mit *N*-Rh-DPPE zu erkennen. Diese werden ebenfalls mit abnehmender Temperatur größer, wie die Bilder bei 45 und 37 °C zeigen. Bei niedrigen Konzentrationen scheint das markierte Cholesterol daher eine DMPC-reiche Umgebung zu bevorzugen.



**Abbildung 5.13** Fluoreszenzbilder (in Falschfarben-Darstellung) der Probe DMPC/DSPC (1:1) 10 mol% Cholesterol mit 1 mol% *N*-Rh-DPPE. Der Balken entspricht 30  $\mu\text{m}$ . Die Bilder zeigen die Vesikeloberfläche.



**Abbildung 5.14** Fluoreszenzbilder (in Falschfarben-Darstellung) der Probe DMPC/DSPC (1:1) 20 mol% Cholesterol mit 1 mol% *N*-Rh-DPPE. Der Balken entspricht 30  $\mu\text{m}$ . Die Bilder zeigen die Vesikeloberfläche.



**Abbildung 5.15** Fluoreszenzbilder (in Falschfarben-Darstellung) der Probe DMPC/DSPC (1:1) 3 mol% BODIPY-Cholesterol. Der Balken entspricht 30  $\mu\text{m}$ . Die Bilder zeigen die Vesikeloberfläche.

### 5.3.4 Diskussion

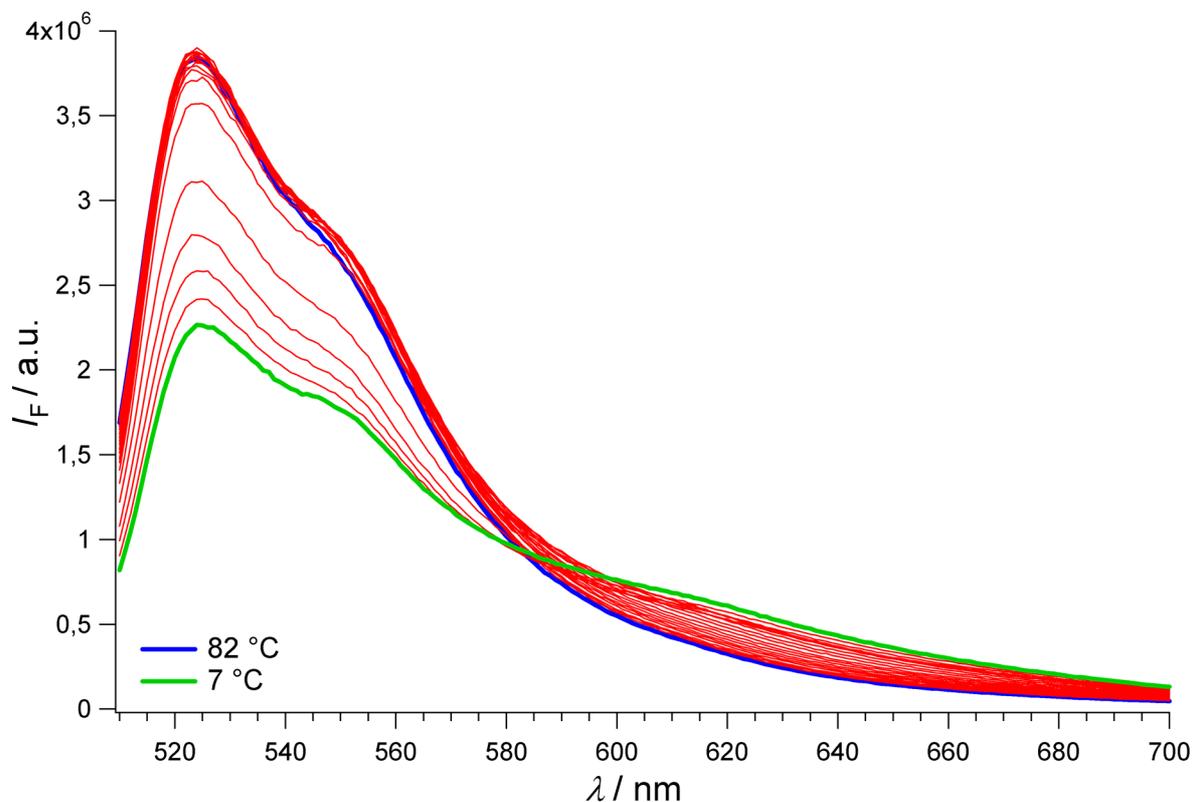
Der Einbau von Cholesterol in eine Modellmembran aus DMPC/DSPC führt zu einer deutlichen Veränderung des Phasenverhaltens und der lateralen Struktur der Lipide. Die GP-Werte zeigen eine deutliche Zunahme der Lipidordnung in der fluiden Phase. In der Fluoreszenzmikroskopie sind bei Temperaturen im Zweiphasengebiet des Lipidgemisches bei einer Cholesterol-Konzentration von 20 mol% keine Gel-Domänen in der Größenordnung von Mikrometern mehr sichtbar. Mit den Ergebnissen der DSC-Messungen kann der Einfluss von Cholesterol durch einen bevorzugten Einbau in DMPC-reiche Regionen beschrieben werden. Die Zugabe von Cholesterol führt demnach in den DMPC-reichen Regionen zu einer Phasenumwandlung in die geordnete fluide  $L_0$ -Phase. Der stärker geordnete Charakter der  $L_0$ -Phase wird durch die deutlich größeren GP-Werte ersichtlich. Die verbleibende Phase wird immer ärmer an der Komponente mit dem niedrigeren Phasenübergang (DMPC) und die Übergangstemperatur wird zu höheren Temperaturen verschoben, wie die Verschiebung des Peaks bei 29 °C in den DSC-Thermogrammen zeigt. Der bevorzugte Einbau des Cholesterols in DMPC-reiche Regionen der Lipiddoppelschicht kann durch die Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie unter Verwendung des markierten Cholesterols bestätigt werden. Diese zeigen eindeutig bei Temperaturen im Zweiphasengebiet die Ausbildung von Domänen mit identischer Form wie im reinen Lipidsystem, die ebenfalls mit sinkender Temperatur größer werden. Da diese Domänen eindeutig den DSPC-reichen Gebieten zuzuordnen sind, wird somit der bevorzugte Einbau des Cholesterols in die DMPC-reichen Regionen bestätigt. Die Anreicherung in der DMPC-reichen Phase erfolgt dabei so lange, bis der größte Teil des DMPC „verbraucht“ ist. Erst dann erfolgt der Einbau des Cholesterols auch in die DSPC-reichen Regionen. Bei einer Konzentration an Cholesterol von 20 mol% liegen dann im ursprünglichen Zweiphasengebiet der reinen Lipidmischung eine geordnete fluide  $L_0$ -Phase und eine DSPC-reiche Gelphase nebeneinander vor. Da die Ausbildung der Domänen in der Fluoreszenzmikroskopie erst durch die unterschiedliche Löslichkeit des *N*-Rh-DPPE in der fluiden und in der Gel-Phase sichtbar wird, kann in diesem Fall möglicherweise auf Grund des fehlenden Kontrastes die Domänenbildung nicht sichtbar gemacht werden, der Fluorophor baut sich scheinbar homogen in die beiden Phasen ein. Geringe Unterschiede im Kettenordnungsparameter zwischen den beiden vorliegenden Lipidphasen können somit mit Hilfe des *N*-Rh-DPPE möglicherweise nicht detektiert werden.

## 5.4 DMPC/DSPC/BL2

### 5.4.1 Fluoreszenzspektroskopie

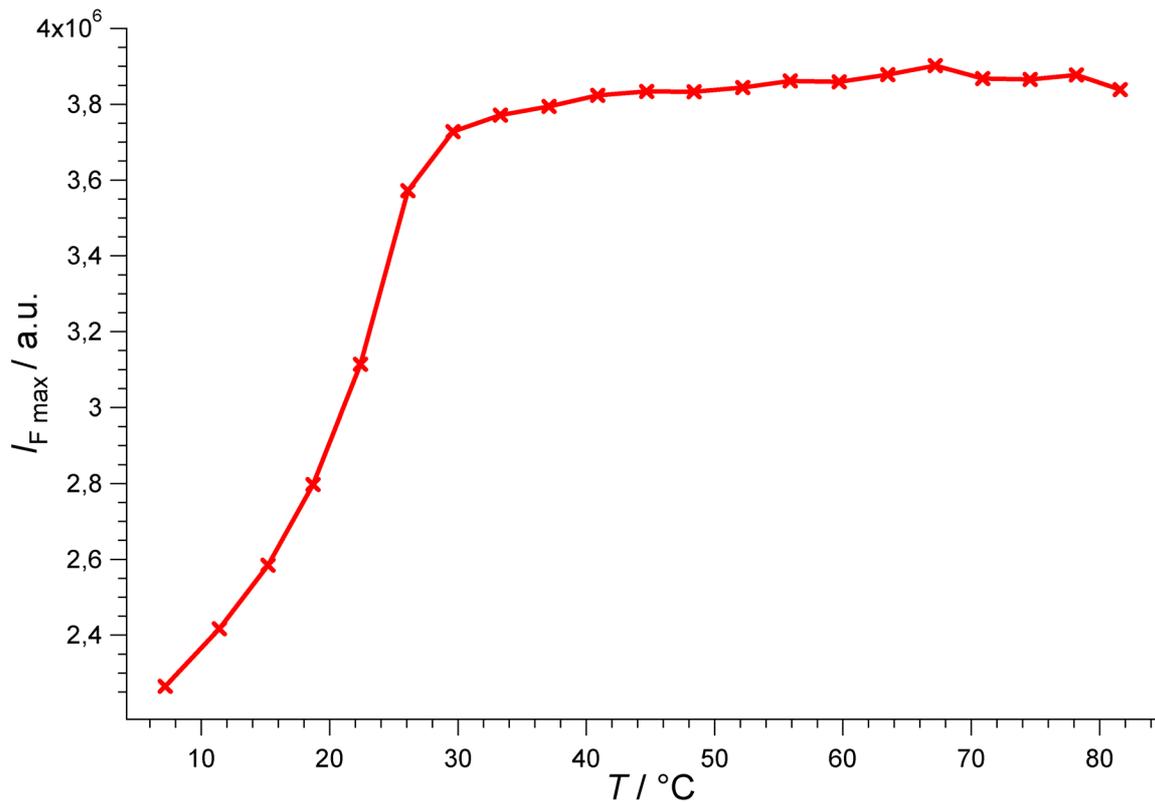
Der Fluorophor BODIPY wird fast ausschließlich in der Fluoreszenzmikroskopie verwendet. Seine photophysikalischen und spektroskopischen Eigenschaften erlauben aber durchaus auch eine Verwendung als empfindliche Sonde in der Fluoreszenzspektroskopie. Dies gilt besonders für die hier untersuchten Systeme aus Lipiden und den lipidierten Peptiden.

Die Emissionsspektren der Probe DMPC 2 mol% BL2 bei verschiedenen Temperaturen sind in Abbildung 5.16 dargestellt.



**Abbildung 5.16** Emissionsspektren der Probe DMPC 2 mol% BL2 bei verschiedenen Temperaturen.

Sehr auffällig ist der für die Fluoreszenz allgemein ungewöhnliche Verlauf der Intensität als Funktion der Temperatur. Bei sehr hohen Temperaturen zeigen die Spektren die größte Intensität; das Spektrum bei 7 °C weist die geringste Intensität auf. Zusätzlich kommt es zu einer Änderung der Spektrenform; denn im Gegensatz zum Absinken der Intensität beim Maximum von ~ 520 nm kommt es im Bereich von ~ 620 nm zu der Ausbildung einer breiten Schulter und zur Erhöhung der Intensität. Die Intensität des Maximums aus jedem Spektrum in Abhängigkeit der Temperatur ist in Abbildung 5.17 dargestellt.



**Abbildung 5.17** Intensität des Maximums der Fluoreszenz von DMPC 2 mol% BL2 als Funktion der Temperatur.

Die maximale Intensität bleibt annähernd konstant bis herunter zu einer Temperatur von  $\sim 30$  °C, im weiteren Verlauf der Abkühlung der Probe fällt die Intensität dann stark ab. Die gute Übereinstimmung mit der Temperatur des Hauptphasenüberganges von DMPC ( $\sim 23$  °C) deutet auf einen starken Einfluss der Lipidphase auf die Emission des BODIPY hin.

Die Abbildung 5.18 zeigt die Emissionsspektren der Probe DSPC/2 mol% BL2 bei unterschiedlichen Temperaturen. Wie bei der Probe mit DMPC ist die Intensität bei hohen Temperaturen höher als bei niedrigen Temperaturen. Die maximalen Intensitäten als Funktion der Temperatur sind in der Abbildung 5.19 dargestellt. Deutlich zu erkennen sind ein im Vergleich zum DMPC stärkerer Abfall der Intensität nach dem Erreichen einer Temperatur von  $\sim 58$  °C und die stärkere Ausbildung der Schulter im Spektrum bei tieferen Temperaturen. Auch in diesem Fall stimmt diese Temperatur sehr gut mit der Temperatur des Hauptphasenüberganges von DSPC ( $\sim 56$  °C) überein.

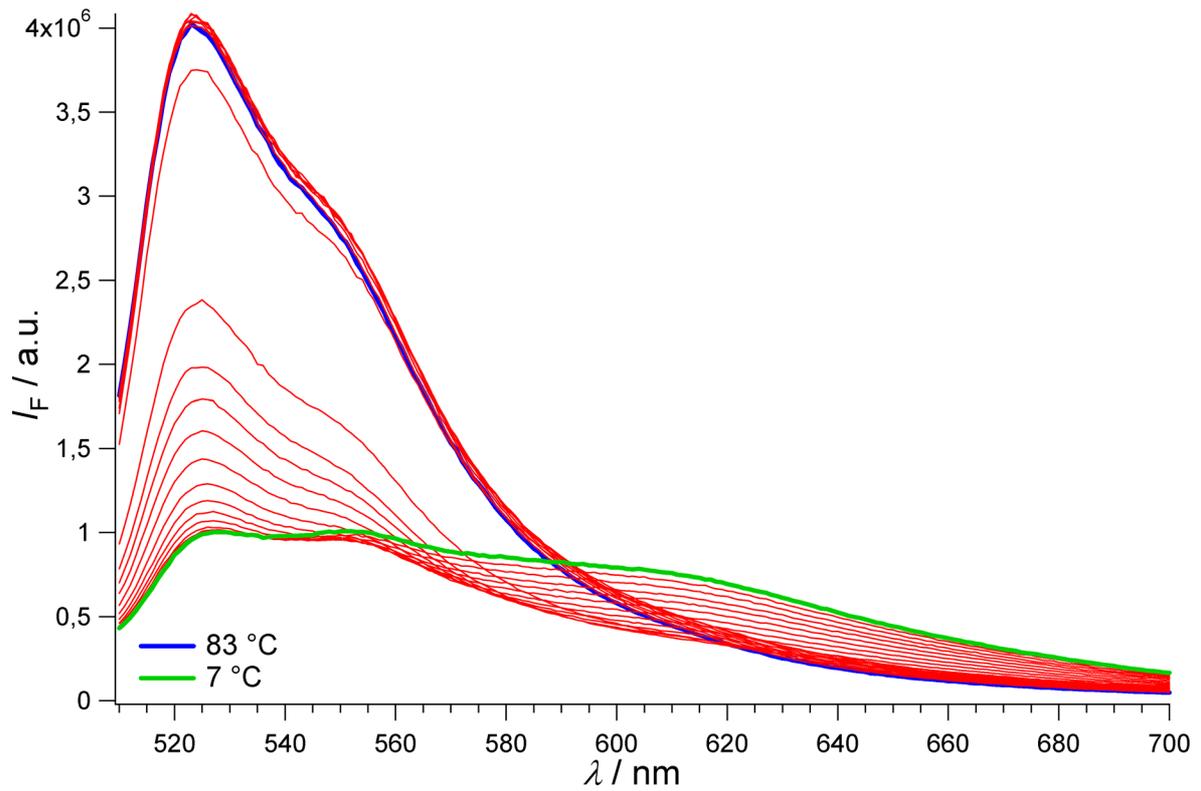


Abbildung 5.18 Emissionsspektren der Probe DSPC 2 mol% BL2 bei verschiedenen Temperaturen.

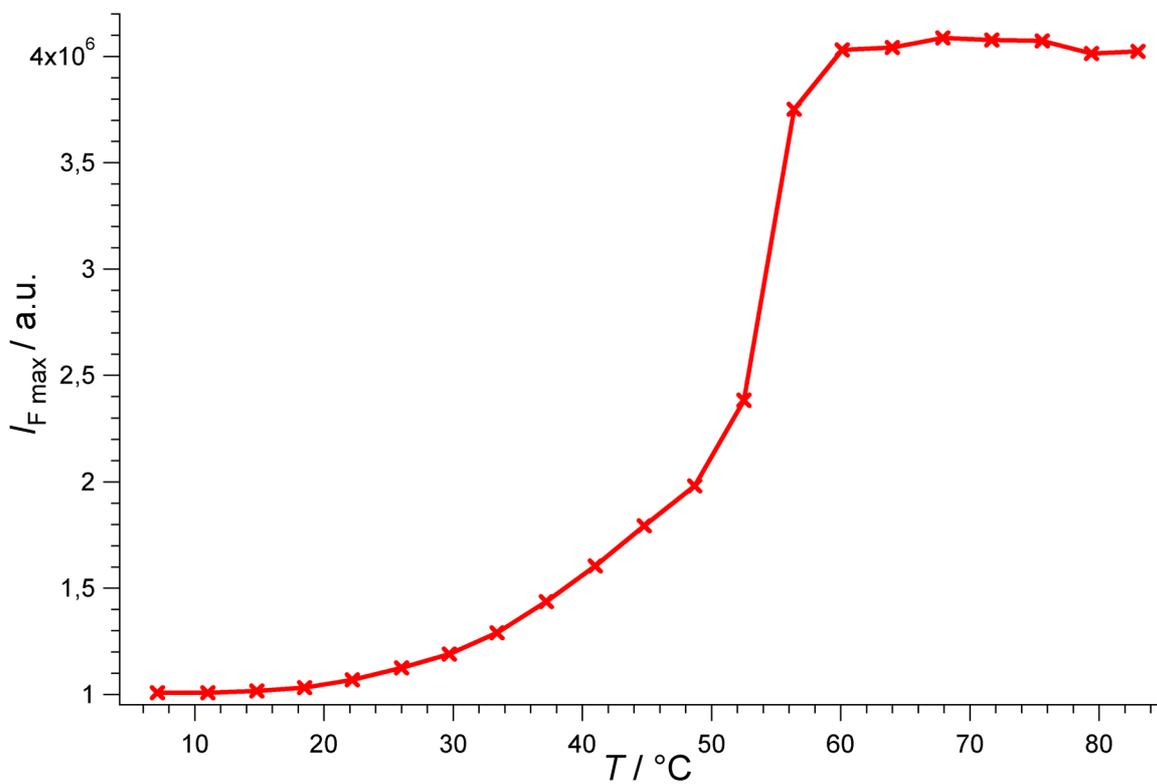
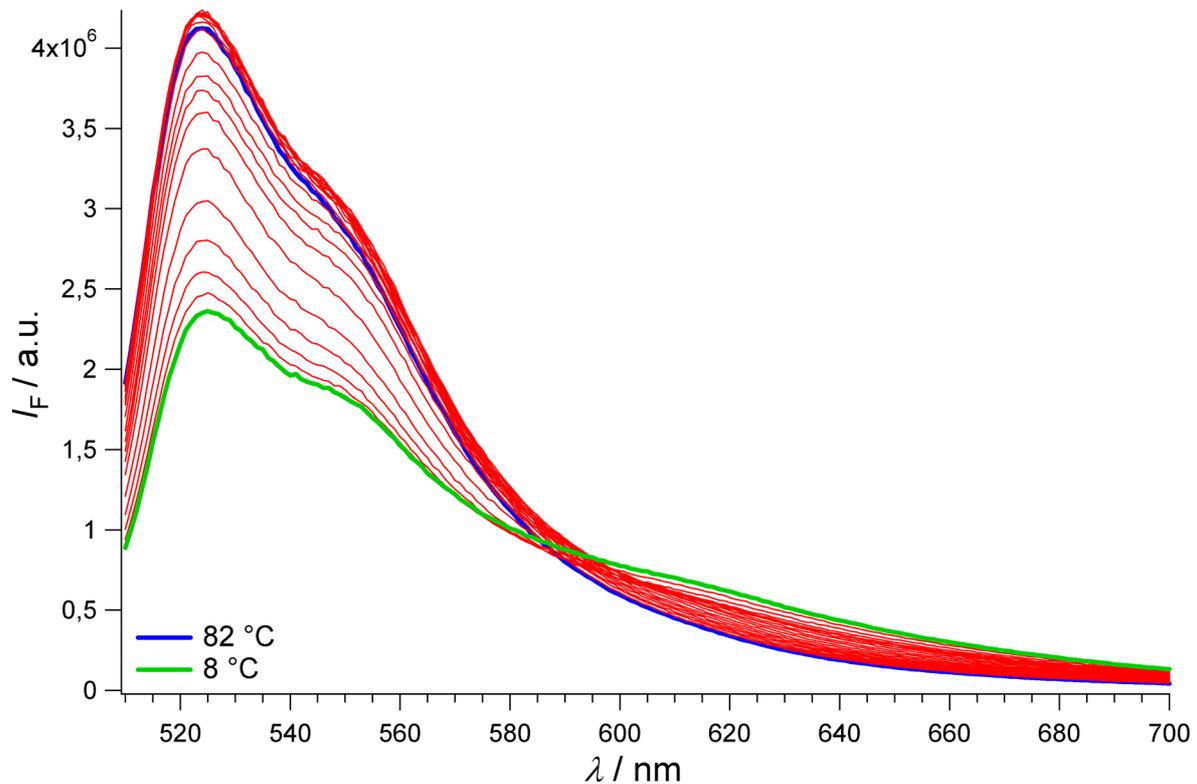


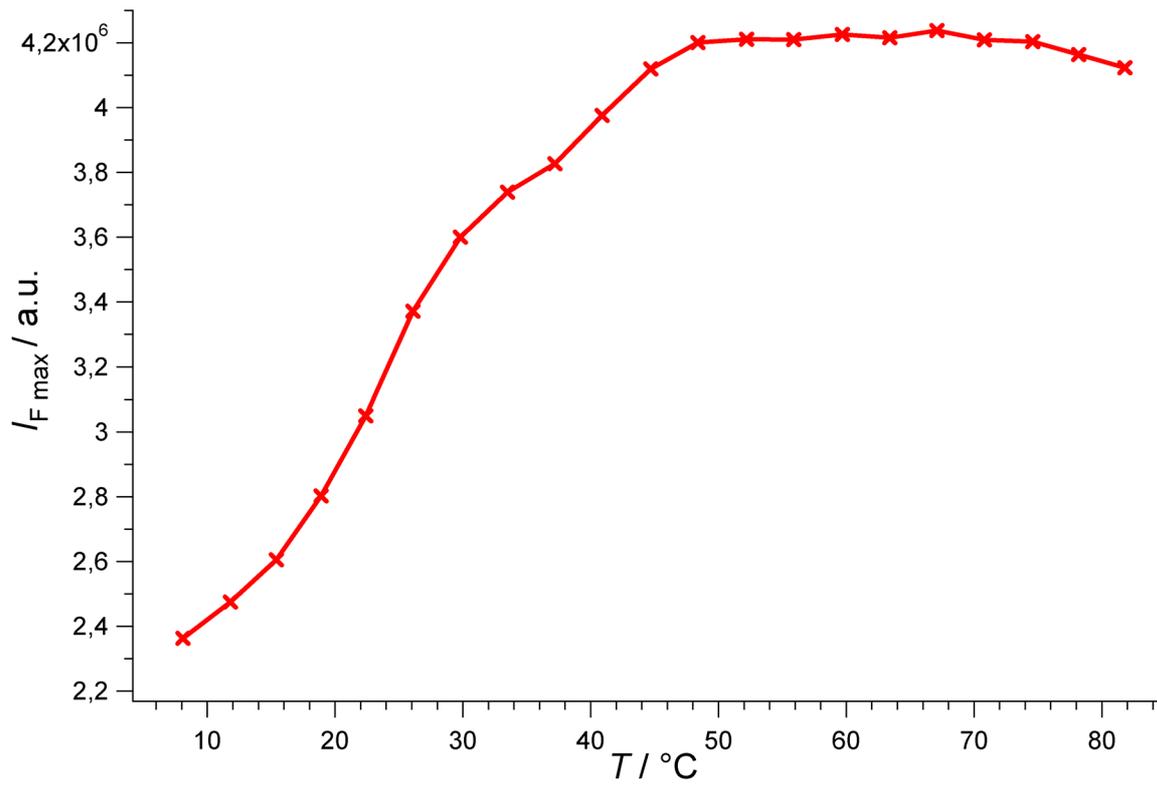
Abbildung 5.19 Intensität des Maximums der Fluoreszenz von DSPC 2 mol% BL2 als Funktion der Temperatur.

Abbildung 5.20 zeigt die Emissionsspektren der Probe DMPC/DSPC (1:1) 2 mol% BL2, aufgenommen bei verschiedenen Temperaturen.



**Abbildung 5.20** Emissionsspektren der Probe DMPC/DSPC (1:1) 2 mol% BL2 bei verschiedenen Temperaturen.

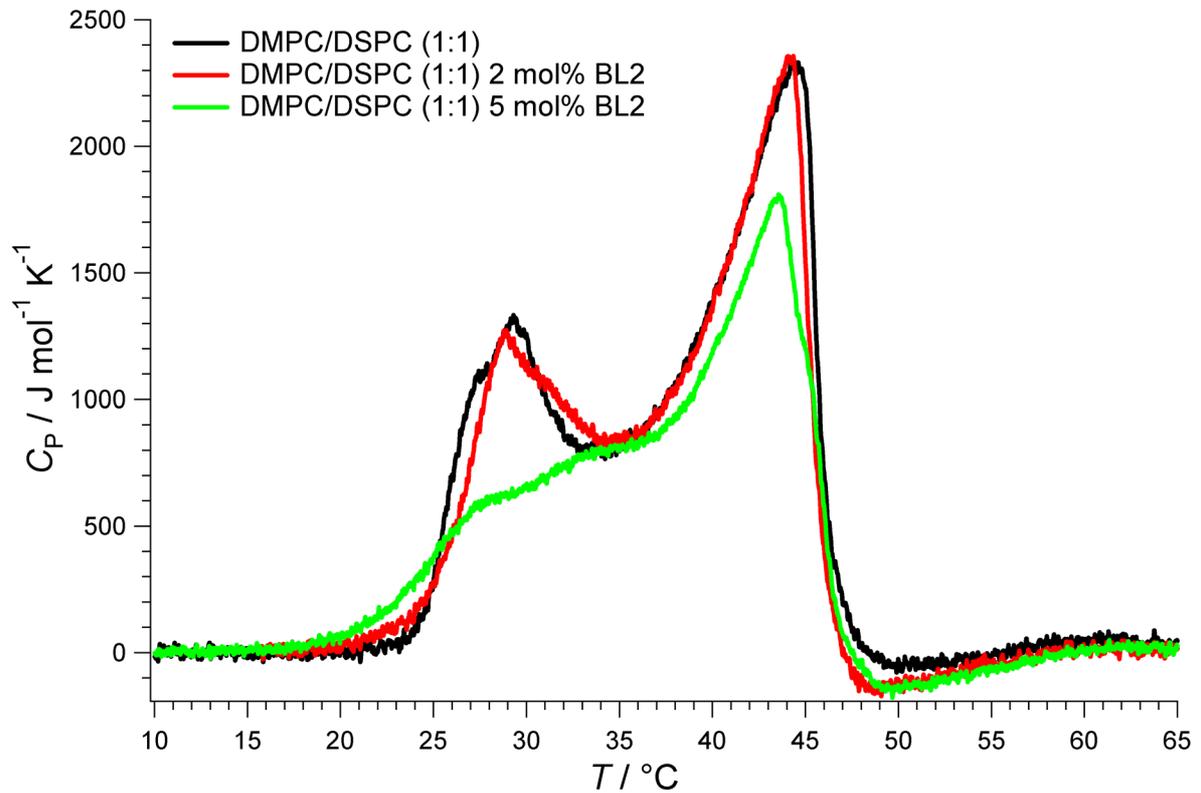
Anders als bei den reinen Lipiden kommt es in diesem Fall zu einer kontinuierlichen Abnahme der Fluoreszenzintensität über einen relativ großen Temperaturbereich. In der Auftragung der Intensitätsmaxima als Funktion der Temperatur in Abbildung 5.21 ist diese Abnahme ab einer Temperatur von  $\sim 50$  °C zu erkennen, wobei dieser Wert sehr gut mit der oberen Temperatur des Zweiphasengebietes der äquimolaren Mischung aus DMPC und DSPC übereinstimmt (s. Abbildung 5.1). Ab einer Temperatur von  $\sim 28$  °C, die der unteren Temperatur des Zweiphasengebietes entspricht, kommt es wie bei den vorherigen Systemen zu einem stärkeren Abfall der Fluoreszenzintensität.



**Abbildung 5.21** Intensität des Maximums der Fluoreszenz von DMPC/DSPC (1:1) 2 mol% BL2 als Funktion der Temperatur.

### 5.4.2 DSC-Messungen

Abbildung 5.22 zeigt die DSC-Thermogramme des binären Lipidsystems DMPC/DSPC bei zwei verschiedenen BL2-Konzentrationen.



**Abbildung 5.22** Basislinienkorrigierte DSC-Thermogramme von DMPC/DSPC mit verschiedenen Konzentrationen an BL2.

Eine Konzentration von 2 mol% BL2, die auch in allen weiteren Experimenten verwendet wurde, hat keinen Einfluss auf das Phasenverhalten des Lipidsystems DMPC/DSPC; die entsprechenden DSC-Thermogramme sind annähernd identisch. Das DSC-Thermogramm der Probe mit 5 mol% BL2 zeigt einen deutlichen Einfluss des lipidierten Peptids auf das Phasenverhalten, besonders auf den Peak bei  $\sim 29^{\circ}\text{C}$ , der dem Schmelzen DMPC-reicher Regionen zugeordnet werden kann.

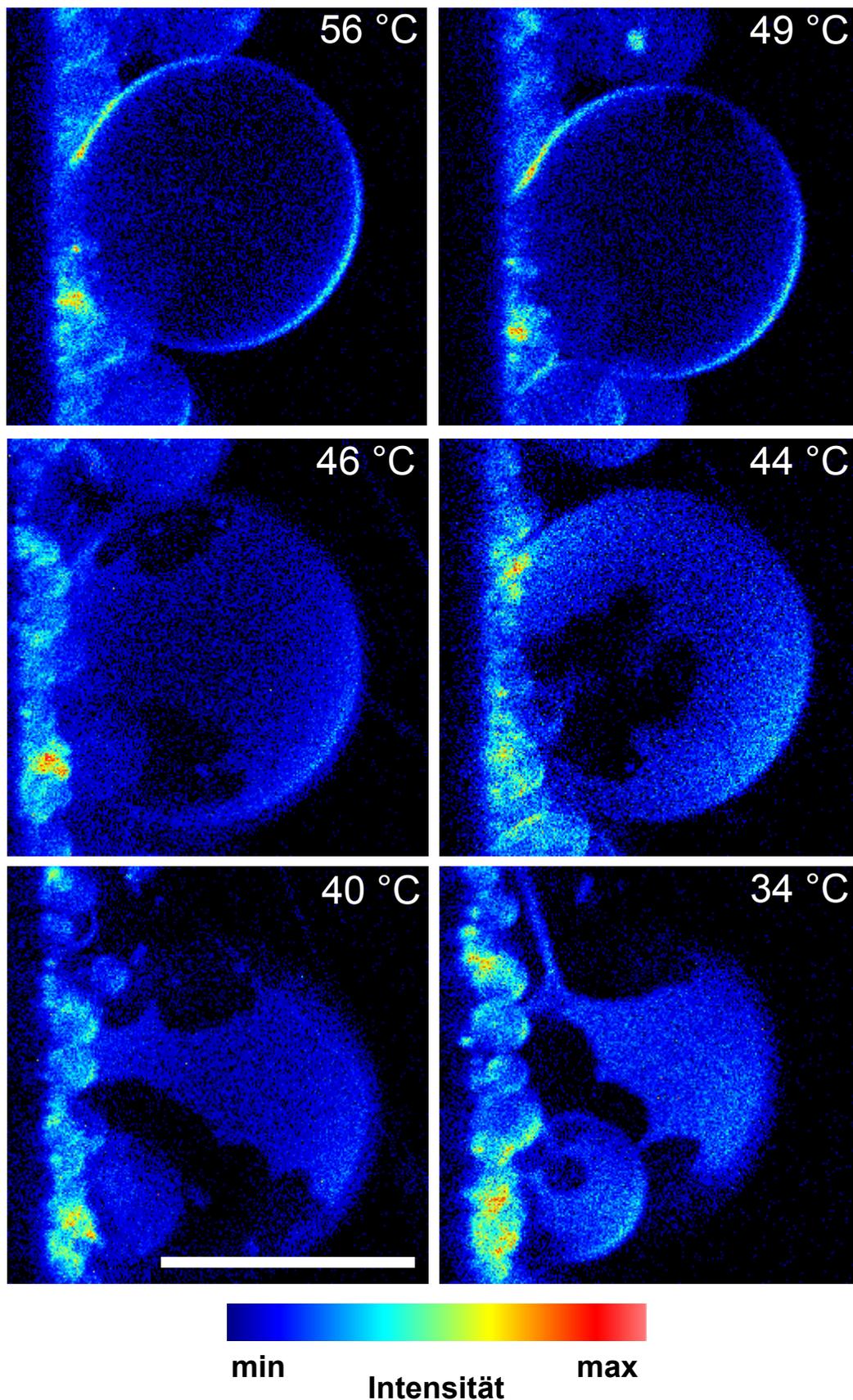
### 5.4.3 Fluoreszenzmikroskopie

Die Verwendung der fluoreszenzmarkierten lipidierten Peptide ermöglicht die direkte Visualisierung der lokalen Anordnung im Mikrometerbereich in der Lipiddoppelschicht. Abbildung 5.23 zeigt als Vergleich mit weiteren Ergebnissen noch einmal die Bilder einer Messung des Systems aus DMPC und DSPC mit dem Fluorophor *N*-Rh-DPPE. Im Zweiphasengebiet zwischen  $\sim 28$  °C und  $\sim 49$  °C sind neben fluoreszierenden auch nichtfluoreszierende dunkle Bereiche sichtbar, die die Phasenkoexistenz von fluider Phase und Gelphase aufzeigen (dunkle Bereiche hier Gel-Bereiche). Mit sinkender Temperatur werden die Gel-Domänen größer, bis bei Temperaturen kleiner als 28 °C die Fluoreszenzintensität auf der Vesikeloberfläche wieder homogen wird.

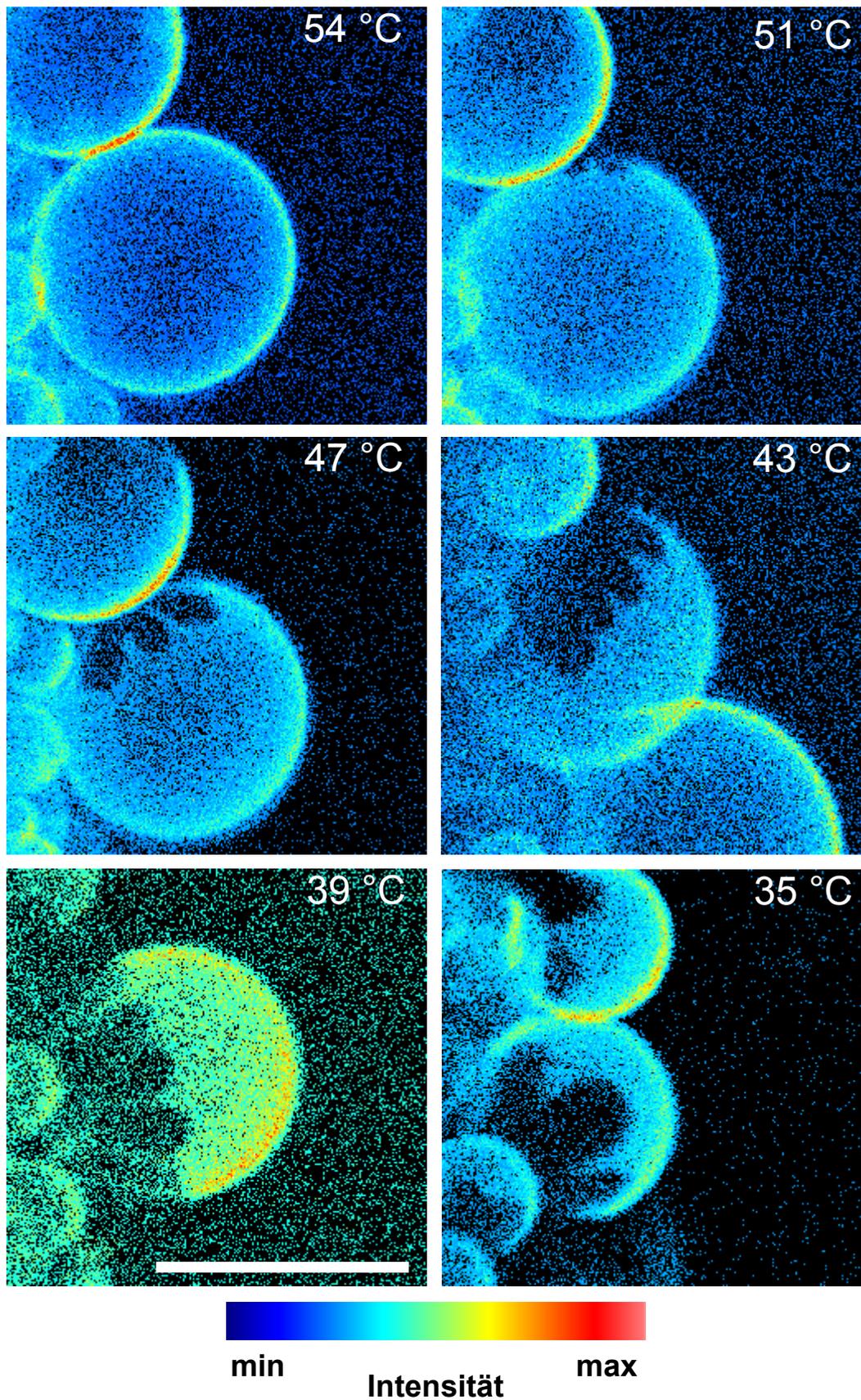
Der Einbau des Peptids BL2 in die Lipidmatrix DMPC/DSPC ist in Abbildung 5.24 dargestellt. Das Bild bei 54 °C zeigt eine homogene Fluoreszenz des BODIPY von der Vesikeloberfläche. Nach Abkühlen auf 51 °C lässt sich am oberen Rand des Vesikels eine kleine dunkle Stelle erkennen, die keine Fluoreszenz aufweist. Auf dem Bild bei 47 °C ist diese Stelle sehr deutlich zu erkennen, wobei die Form der Domänen der des reinen Lipidsystems mit *N*-Rh-DPPE sehr ähnlich ist. Ein weiteres Absinken der Temperatur bewirkt eine ansteigende Ausbreitung der Domänen auf der Vesikeloberfläche.

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass es sich bei diesen Domänen wie im Falle des reinen Lipidsystems um Gel-artige Lipiddomänen handelt. Zur Überprüfung dieser Annahme wurde ein Experiment mit dem lipidierten Peptid BL2 und dem Fluorophor *N*-Rh-DPPE zusammen in einer Probe durchgeführt. Dabei wurde die Emission des BODIPY im Kanal 1 und die Emission des *N*-Rh-DPPE im Kanal 2 detektiert. In Abbildung 5.25 sind die Bilder der beiden Kanäle bei ausgewählten Temperaturen nebeneinander dargestellt. Bei 57 °C zeigen beide Kanäle eine homogene Vesikeloberfläche. Auf Grund der größeren Quantenausbeute und der effektiveren Anregung durch den Laser bei 780 nm weisen die Bilder mit dem *N*-Rh-DPPE eine deutlich höhere Intensität auf als die mit dem BODIPY.

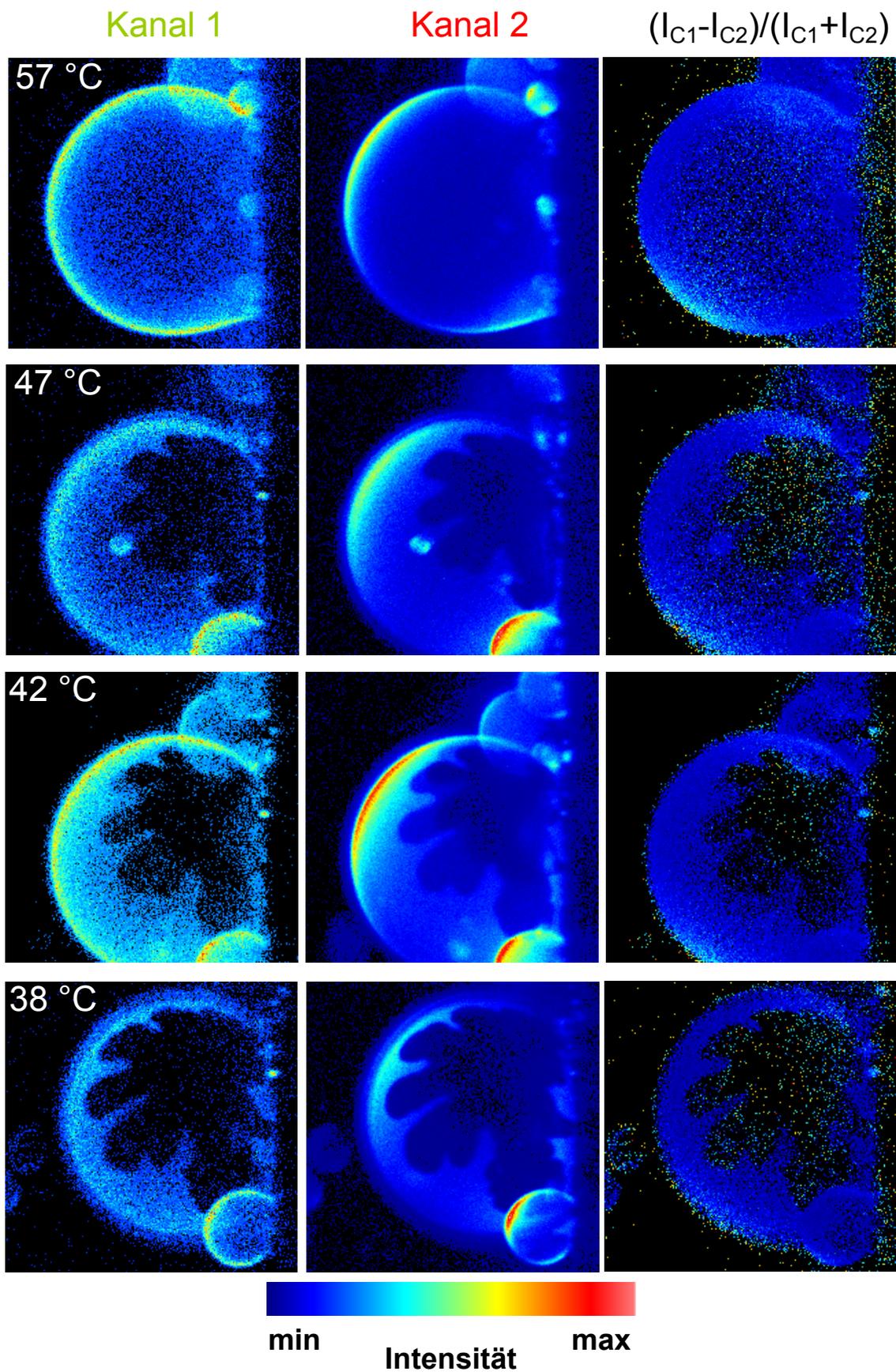
Bei einer Temperatur von 47 °C sind in beiden Kanälen große nicht fluoreszierende Bereiche mit identischer Form zu erkennen, deren Größe mit sinkender Temperatur zunimmt. Durch die Berechnung der Intensitäten aus den beiden Kanälen kann die Übereinstimmung der Domänen verdeutlicht werden. Das Ergebnis ist in der dritten Spalte der Abbildung 5.25 dargestellt. Die in den berechneten Bildern erkennbaren Domänen haben exakt die Größe wie die Domänen in den Kanälen 1 und 2. Als Ergebnis lässt sich daher festhalten, dass sich das lipidierte Peptid BL2 bevorzugt in die fluide Phase der Lipiddoppelschicht einbaut.



**Abbildung 5.23** Fluoreszenzbilder (in Falschfarben-Darstellung) der Probe DMPC/DSPC (1:1) mit 1 mol% *N*-Rh-DPPE. Der Balken entspricht 20  $\mu\text{m}$ . Die Bilder zeigen die Vesikeloberfläche.

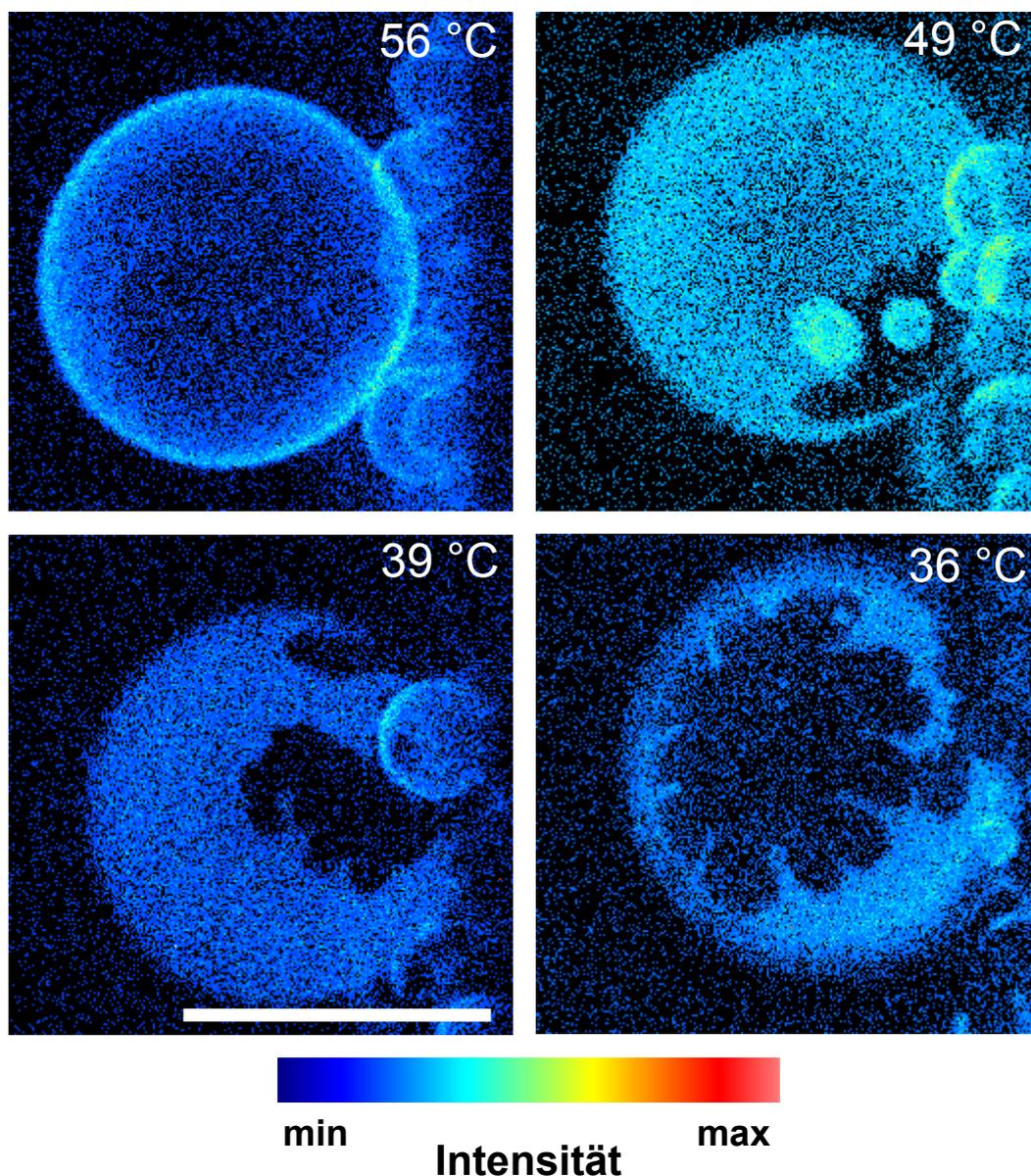


**Abbildung 5.24** Fluoreszenzbilder (in Falschfarben-Darstellung) der Probe DMPC/DSPC (1:1) 2 mol% BL2. Der Balken entspricht 30  $\mu\text{m}$ . Die Bilder zeigen die Vesikeloberfläche.



**Abbildung 5.25** Fluoreszenzbilder (in Falschfarben-Darstellung) der Probe DMPC/DSPC (1:1) mit 2 mol% BL2 und 0,25 mol% *N*-Rh-DPPE. Die Bilder zeigen die Vesikeloberfläche.

Experimente mit den Peptiden CP177A und BL258-15 sollen helfen, den Einfluss der Lipidmodifizierung auf den Einbau der Peptide in die Lipidmatrix zu verstehen. Der Einbau des Peptids CP177A in das Lipidgemisch DMPC/DSPC ist in Abbildung 5.26 dargestellt. Genau wie bei dem Peptid BL2 ist auch bei dem nur palmitoylierten Peptid deutlich die Ausbildung von nicht fluoreszierenden Bereichen erkennbar, die auf die Phasenkoexistenz von Gel- und fluiden Phase hinweisen. Auch das nur farnesylierte Peptid zeigt dieses Verhalten (Bilder nicht gezeigt). Die hier untersuchten lipidierten Peptide bauen sich also unabhängig vom Ankersystem alle bevorzugt in die fluide Phase der DMPC/DSPC-Lipiddoppelschicht ein.

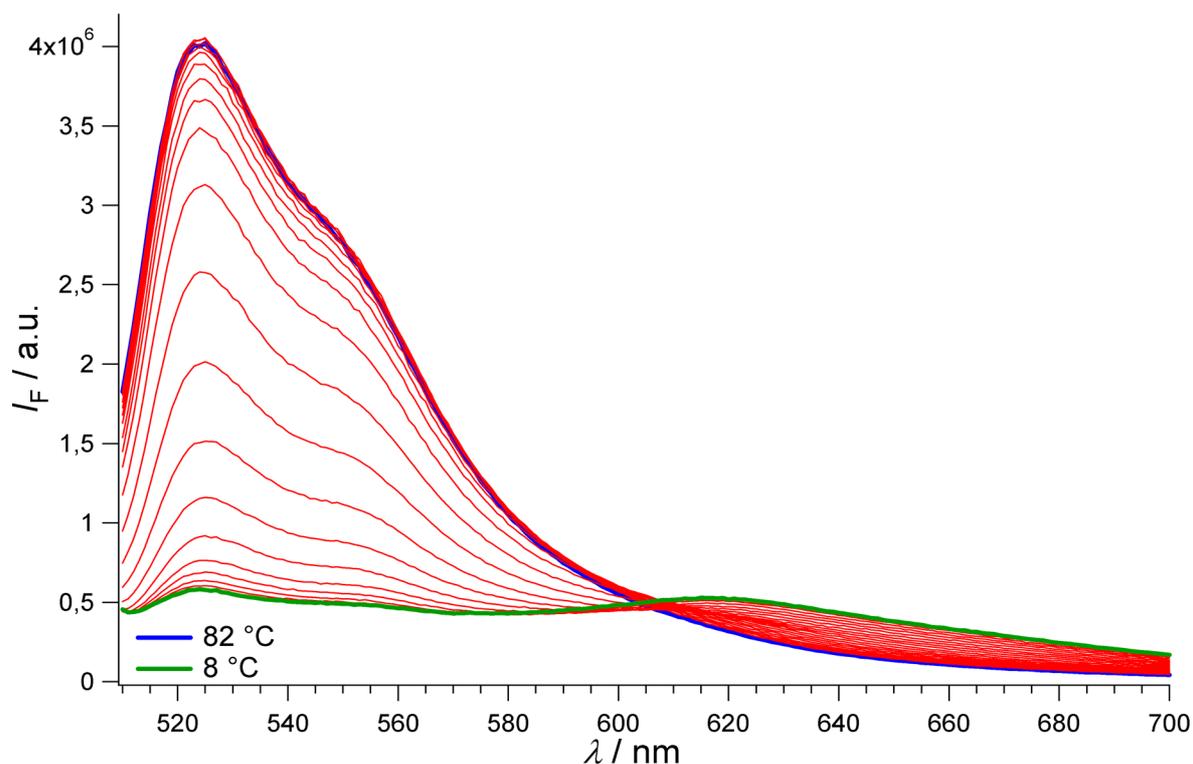


**Abbildung 5.26** Fluoreszenzbilder (in Falschfarben-Darstellung) der Probe DMPC/DSPC (1:1) 2 mol% CP177A. Der Balken entspricht 25  $\mu\text{m}$ . Die Bilder zeigen die Vesikeloberfläche.

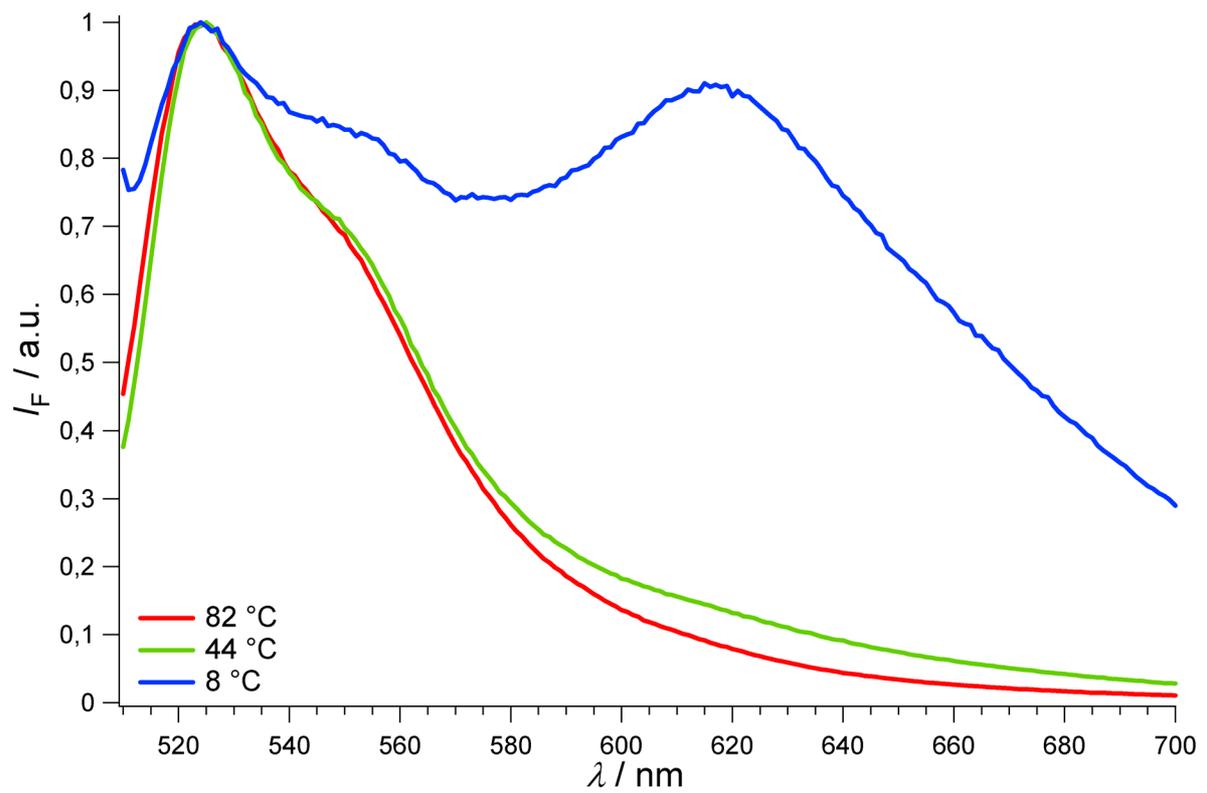
## 5.5 DMPC/DSPC/Cholesterol/BL2

### 5.5.1 Fluoreszenzspektroskopie

Der zusätzliche Einbau von 20 mol% Cholesterol in das System DMPC/DSPC/BL2 führt zu einer drastischen Veränderung im Vergleich zur Probe ohne Cholesterol. Abbildung 5.27 zeigt die dazugehörigen Emissionsspektren bei unterschiedlichen Temperaturen. Mit fallender Temperatur kommt es zu einer sehr starken Intensitätsabnahme im Bereich des Maximums von  $\sim 520$  nm, wobei die Ausbildung eines zweiten Maximums bei  $\sim 625$  nm sichtbar wird. Bei tieferen Temperaturen weist dieses Maximum sogar eine fast identische geringe Intensität auf wie das Maximum bei  $\sim 520$  nm. Der Einfluss der Temperatur auf die Form der Emissionsspektren ist für drei Temperaturen in Abbildung 5.28 dargestellt. Ab einer Temperatur von  $44$  °C kommt es zu einer deutlichen Ausbildung der Schulter im Emissionsspektrum, bis bei tiefen Temperaturen die zweite Bande deutlich ausgeprägt sichtbar wird. Der Einbau von Cholesterol hat demnach großen Einfluss auf die direkte Umgebung der BODIPY-Moleküle, denn die zusätzliche Bande der Emission bei 620 nm deutet auf eine Dimerbildung des Fluorophors hin. Die Abnahme der Intensität bei 525 nm ist nicht mit einem starken Anstieg der Intensität bei 620 nm verbunden, da die Übergangsdipolmomente der beiden Übergänge unterschiedlich sind.



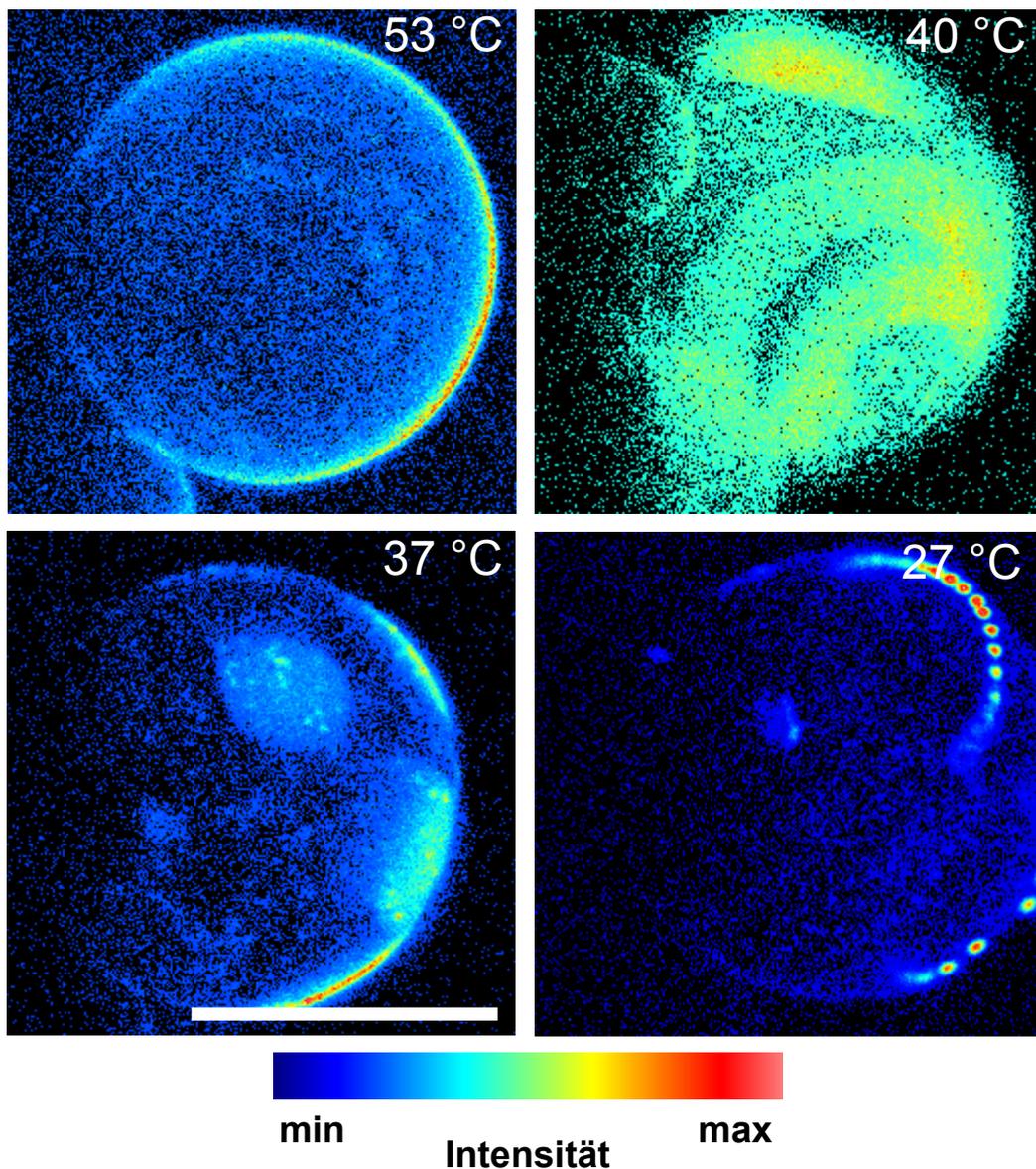
**Abbildung 5.27** Emissionsspektren der Probe DMPC/DSPC (1:1) 20 mol% Cholesterol 2 mol% BL2 bei verschiedenen Temperaturen.



**Abbildung 5.28** Normierte Emissionsspektren der Probe DMPC/DSPC (1:1) 20 mol% Cholesterol 2 mol% BL2 bei drei verschiedenen Temperaturen.

### 5.5.2 Fluoreszenzmikroskopie

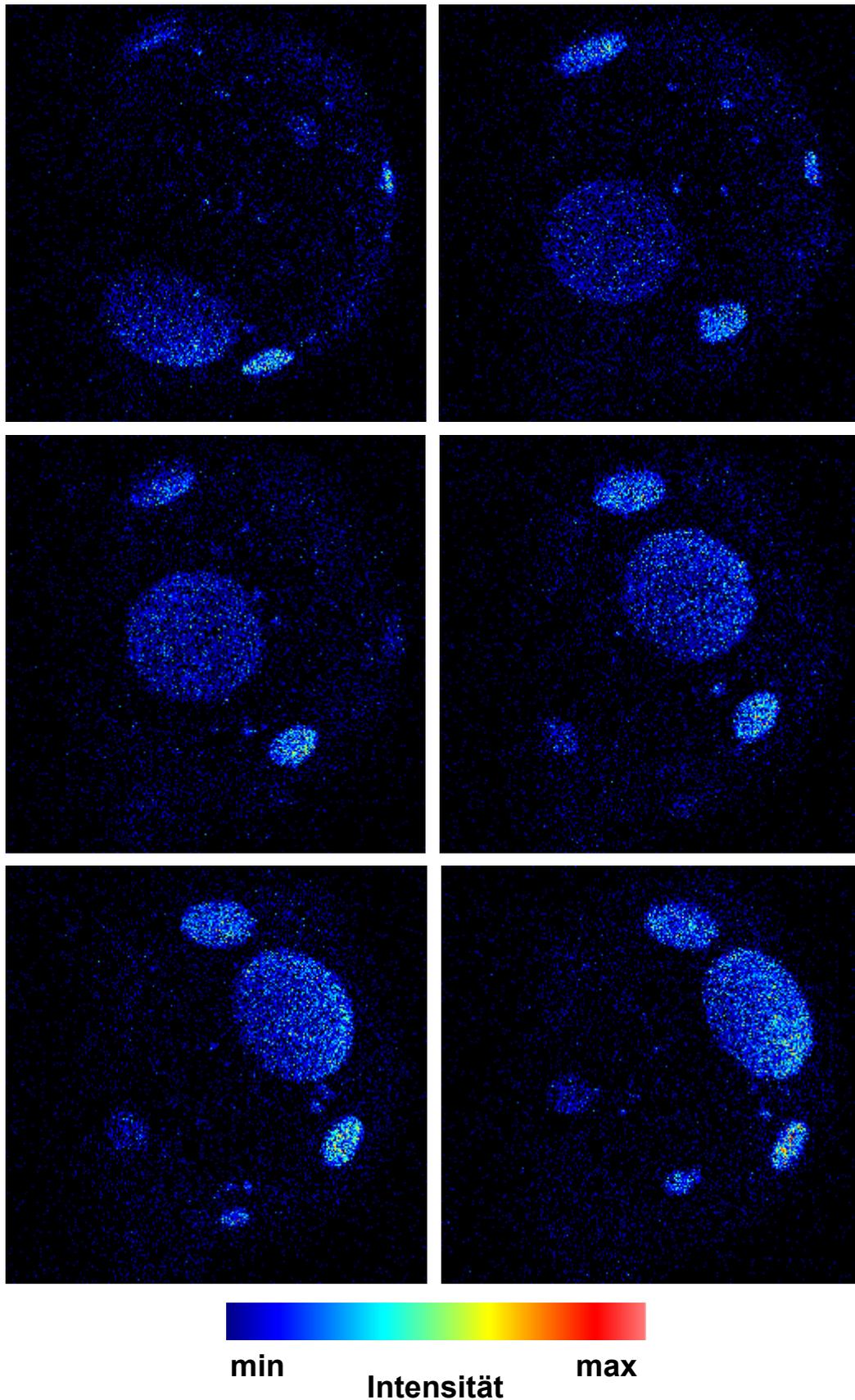
Wie oben gezeigt, unterbindet Cholesterol bei einer Konzentration von  $> 10$  mol% die Ausbildung von großen Gel-Domänen im System DMPC/DSPC. Der Einbau von 2 mol% BL2 in das System aus DMPC/DSPC mit 20 mol% Cholesterol führt aber zu einer drastischen Veränderung der lateralen Lipidstruktur. Die Ergebnisse dieser Messung sind in Abbildung 5.29 dargestellt.



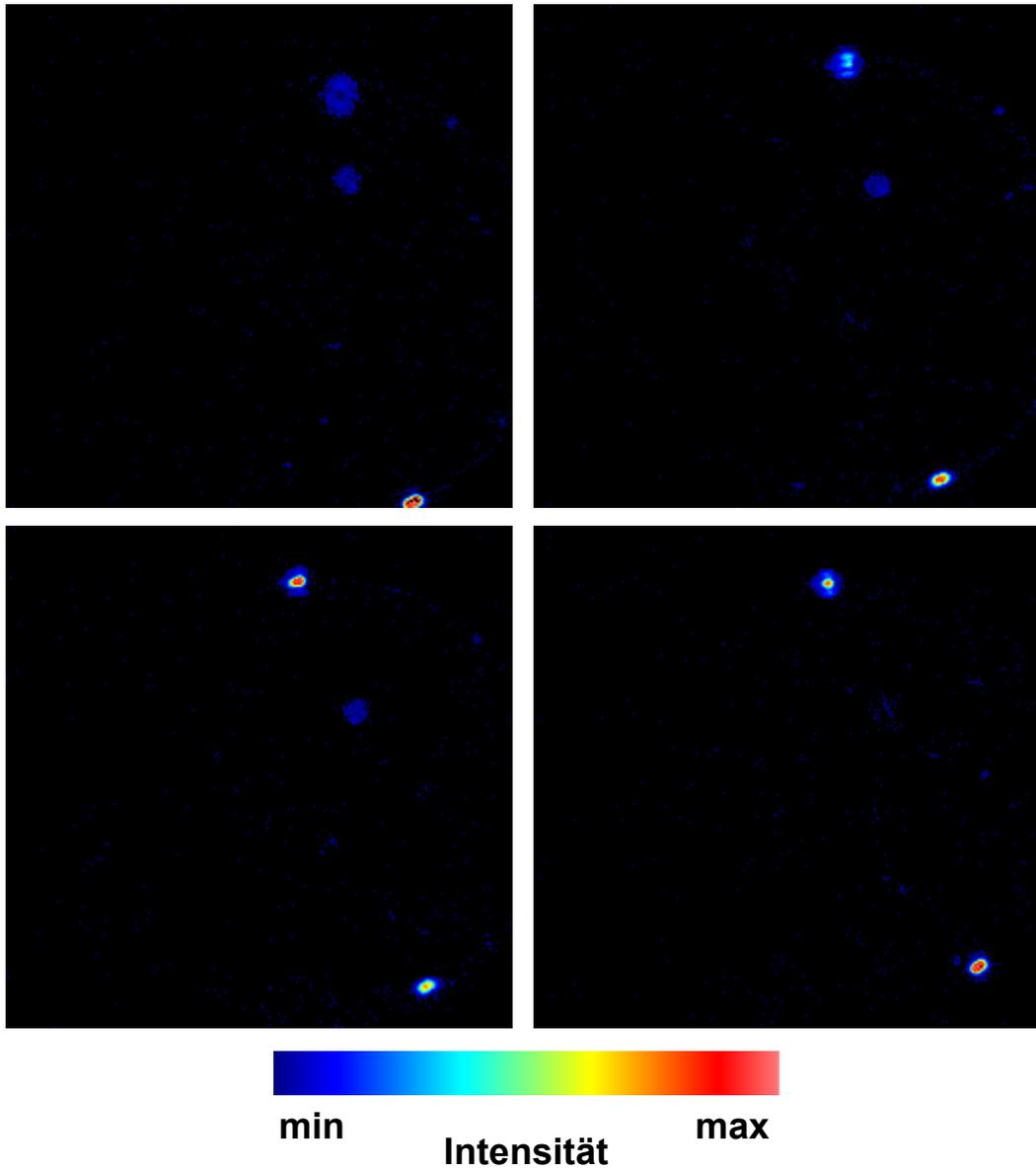
**Abbildung 5.29** Fluoreszenzbilder (in Falschfarben-Darstellung) der Probe DMPC/DSPC (1:1) 20 mol% Cholesterol 2 mol% BL2. Der Balken entspricht 25  $\mu\text{m}$ . Die Bilder zeigen die Vesikeloberfläche.

---

Das Bild bei einer Temperatur von 53 °C zeigt das schon bekannte Verhalten in der flüssigkristallinen Phase, nämlich die homogene Verteilung der Peptide. Jedoch schon das Bild bei 40 °C zeigt den Unterschied zur Probe ohne das Peptid BL2. Das aus mehreren Einzelbildern zusammengesetzte Bild zeigt deutlich helle Bereiche auf der Vesikeloberfläche, bei 37 °C sind diese hellen Bereiche noch besser zu erkennen. Im Gegensatz zu den bisherigen Proben bilden sich also Bereiche mit einer viel größeren Fluoreszenzintensität auf der Vesikeloberfläche aus. Diese Bereiche wandern über die Vesikeloberfläche mit einer ungefähren Wanderungsgeschwindigkeit von  $0,2 \mu\text{m s}^{-1}$  und werden mit sinkender Temperatur immer kleiner. Zur Verdeutlichung der Bewegung sind in den Abbildungen 5.30 und 5.31 Bilder bei einer Temperatur zeitabhängig dargestellt. Bei einer Temperatur von 38 °C sind mehrere große helle Bereiche auf der Vesikeloberfläche erkennbar, die sich über die Oberfläche bewegen. Diese Bewegung ist in den addierten Bildern der Abbildung 5.29 als Streifenbildung sichtbar. Bei einer Temperatur von 30 °C sind nur noch sehr kleine ( $\varnothing \sim 0,1 \mu\text{m}$ ), aber dafür sehr helle Stellen auf der Oberfläche der Vesikel erkennbar. Es findet kaum noch eine Bewegung auf der Oberfläche statt, die Wanderungsgeschwindigkeit kann zu  $\sim 0,04 \mu\text{m s}^{-1}$  abgeschätzt werden.



**Abbildung 5.30** Fluoreszenzbilder (in Falschfarben-Darstellung) der Probe DMPC/DSPC (1:1) 20 mol% Cholesterol 2 mol% BL2 als Funktion der Zeit bei  $T = 38\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Zwischen den einzelnen Bildern liegen  $\sim 10\text{ s}$ .



**Abbildung 5.31** Fluoreszenzbilder (in Falschfarben-Darstellung) der Probe DMPC/DSPC (1:1) 20 mol% Cholesterol 2 mol% BL2 als Funktion der Zeit bei  $T = 30\text{ °C}$ . Zwischen den einzelnen Bildern liegen  $\sim 10\text{ s}$ .

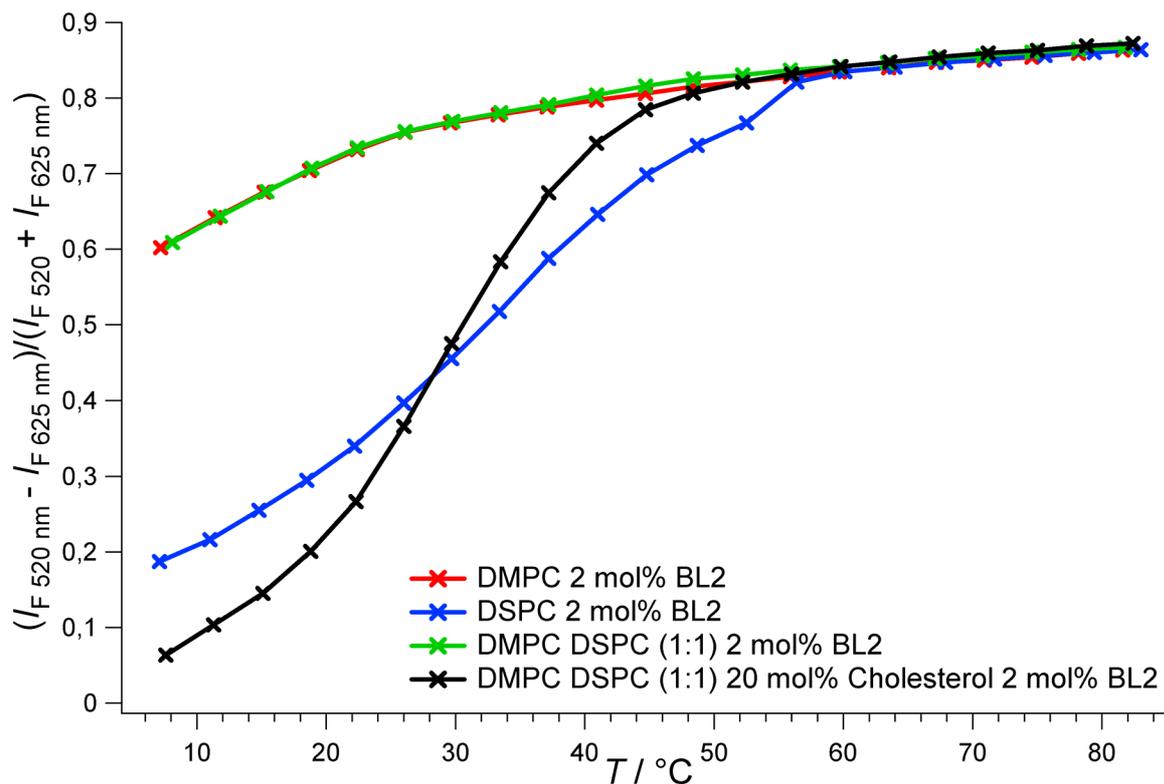
### 5.5.3 Diskussion

Der Einbau von 20 mol% Cholesterol in die äquimolare Mischung aus DMPC und DSPC führt zu einer Unterdrückung der Ausbildung großer Gel-artiger Domänen. Die Zugabe von 2 mol% des Peptids BL2 zu diesem System bewirkt eine Phasenseparation, die durch die hohe Affinität des Peptids zu einer DMPC-reichen fluiden Phase induziert wird. Diese Schlussfolgerung wird durch die Form der Domänen und die abnehmende Größe der Domänen mit sinkender Temperatur unterstützt. Die Phasenseparation führt zu einer Bildung von Bereichen mit einer höheren Fluoreszenzintensität, die mit abnehmender Temperatur immer kleiner werden. In diesen kleinen Domänen nimmt die lokale Konzentration des BODIPY ständig zu und führt zur Bildung von Dimeren des BODIPY. Diese Dimerbildung wird in den fluoreszenzspektroskopischen Messungen deutlich. Die Ergebnisse für die Probe mit Cholesterol und dem BL2 zeigen bei tiefen Temperaturen ein zweites Emissionsmaximum, das eindeutig der Bildung von Dimeren des BODIPY zuzuschreiben ist. Zur Verdeutlichung und Quantifizierung wird auf die Daten ein einfaches Zweizustandsmodell angewendet, bei dem die Differenz der Intensitäten der Monomer- und der Dimeremission, normiert auf die Gesamtintensität der beiden Emissionen, berechnet wird. Diese relative Intensitätsdifferenz in Abhängigkeit der Temperatur ist in Abbildung 5.32 für die verschiedenen Lipidsysteme dargestellt. Auffallend ist die sehr gute Übereinstimmung der Datenpunkte von DMPC 2 mol% BL2 und dem Lipidgemisch mit dem Peptid. Entscheidend für das Verhalten des lipidierten Peptids ist daher nur die DMPC-reiche Umgebung, in der es sich bevorzugt aufhält. Das DSPC in der Mischung übt daher annähernd keinen Einfluss auf das BODIPY-gelabelte Peptid aus. Dies bestätigt auf sehr anschauliche Weise die Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen, bei denen der bevorzugte Einbau des Peptids in die fluide Phase der Lipiddoppelschicht beobachtet wird.

Die fluoreszenzspektroskopischen Ergebnisse der Probe DMPC/DSPC mit 20 mol% Cholesterol und 2 mol% BL2 sind ganz typisch für die Bildung von Dimeren des BODIPY. Die Konzentration der Dimere ist sogar größer als die in der Probe DSPC 2 mol% BL2, in der das Lipid bei Temperaturen unterhalb von 56 °C eine geordnete Gelphase ausbildet. Diese Daten bestätigen ebenfalls die Ergebnisse aus der Fluoreszenzmikroskopie, die eine hohe lokale Konzentration an lipidierten Peptiden in kleiner werdenden Domänen mit sinkender Temperatur aufzeigen.

Ein effektiver Sortierungsmechanismus der Lipide im Bereich der tiefen Temperaturen ist nicht mehr möglich, da die mittlere Konformationsordnung der Kohlenwasserstoffketten in der Membran drastisch zugenommen hat und die Ausbildung der Gelphase in der Lipiddoppelschicht stark favorisiert ist. Als Konsequenz ergibt sich eine Aggregation des Peptids in kleinen Clustern. Aus den Ergebnissen lässt sich allgemein folgern, dass die doppelte Lipidmodifizierung durch eine Palmitoyl- und eine Farnesylgruppe in Proteinen wie Ras keine signifikante Assoziation mit fluiden geordneten  $L_0$  oder Gel-artigen Domänen in phasenseparierten Membranen bewirkt und es somit zu keiner Anreicherung in „lipid rafts“ kommt.

Diese Schlussfolgerungen stimmen mit den Ergebnissen aus Fluoreszenz-Quenching-Experimenten überein, die an palmitoylierten und isoprenylierten Peptiden in anderen phasentemischten fluid-geordneten/fluid-ungeordneten Modellmembransystemen gefunden wurden [Wang 2001, Wang 2002].



**Abbildung 5.32** Monomer-Dimer-Emission verschiedener Lipidproben mit dem Peptid BL2.

## 5.6 Einbau des Ras-Proteins N-Ras G12V181

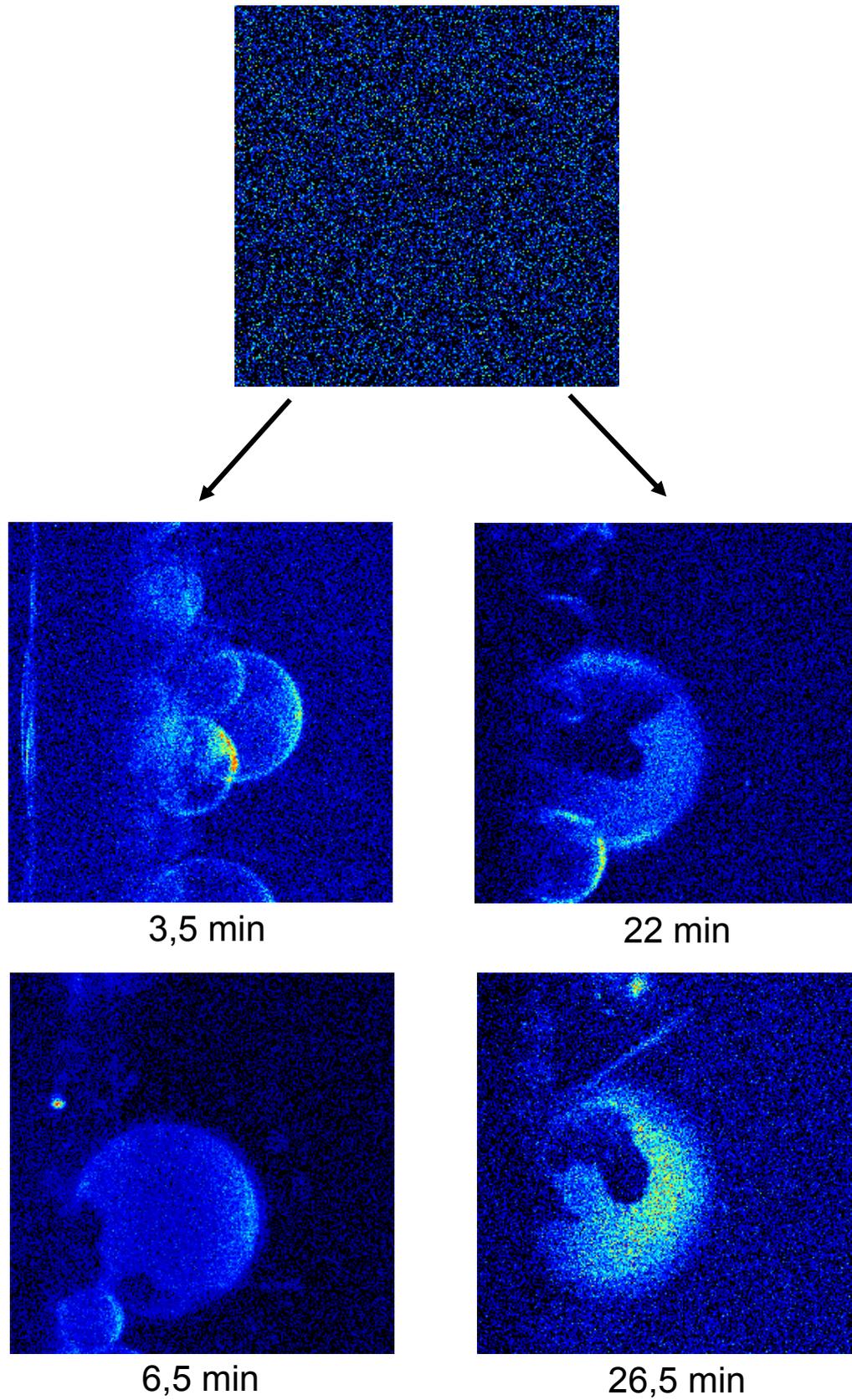
In den bisherigen Studien zur Untersuchung des Einbaus von lipidmodifizierten Peptiden wurde überwiegend mit kleinen Peptiden gearbeitet, die dieselbe Struktur der Lipidanker aufweisen wie die entsprechenden Proteine und daher als Modellpeptide fungieren sollen. Dafür gibt es überwiegend zwei Gründe, und zwar zum einen die sehr aufwendige Präparation der modifizierten vollständigen aktiven Proteine und zum anderen die Einschränkungen bei der Präparation von GUV, für die die Verwendung von organischen Lösungsmitteln wie Chloroform essentiell ist, was sich aber für das Arbeiten mit Proteinen verbietet.

Da für die Fluoreszenzmikroskopie nur sehr geringe Mengen an biologischem Material benötigt werden, war es möglich, den Einbau eines durch BODIPY markierten Fragments des N-Ras mit der Bezeichnung N-Ras G12V181 + MIC7Cys(Far)ED BODIPY in die Lipidmatrix DMPC/DSPC zu untersuchen. Dieses Protein wurde uns von Dr. J. Kuhlmann vom Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie in Dortmund zu Verfügung gestellt. Als Ankersystem dient in diesem Fall ein farnesyliertes Peptid, bei dem der N-Terminus mit dem Proteinfragment und der C-Terminus mit dem BODIPY verknüpft sind.

Zur Durchführung des Experimentes wurden GUV aus DMPC und DSPC im äquimolaren Verhältnis gebildet und die Temperatur in der Zelle auf 37 °C abgesenkt. Mit Hilfe der CCD-Kamera des Mikroskops wurde ein Vesikel ausgewählt und zeitabhängig mikroskopiert. Das in 200 µL destilliertem Wasser gelöste Protein (~ 0,1 µg) wurde im Anschluss direkt in die Kammer (Volumen ~ 3 µL) injiziert (jeweils 100 µL pro Experiment).

Abbildung 5.33 zeigt die beiden durchgeführten Experimente. Das obere Bild zeigt den Ausschnitt vor der Injektion des Proteins, links und rechts sind jeweils ausgewählte Bilder nach der Injektion zu bestimmten Zeiten abgebildet. Kurz nach der Injektion zeigen die Bilder eine starke Fluoreszenz, die durch das Protein im Wasser hervorgerufen wird. Nach einigen Minuten lassen sich die Umrisse der Vesikel erkennen, bis wiederum einige Minuten später auch die Domänen auf der Oberfläche sichtbar werden.

Diese Ergebnisse machen deutlich, dass es bei der Verfügbarkeit der entsprechenden Proteine möglich sein wird, auch kinetische Experimente unter Verwendung der Fluoreszenzmikroskopie an biologisch interessanten Systemen durchzuführen. Durch die Entwicklung spezieller Testsysteme ist es dann vielleicht auch möglich, Enzymaktivitäten in Abhängigkeit der Lipidmatrix unter Verwendung der Methode der Fluoreszenzmikroskopie zu ermitteln.

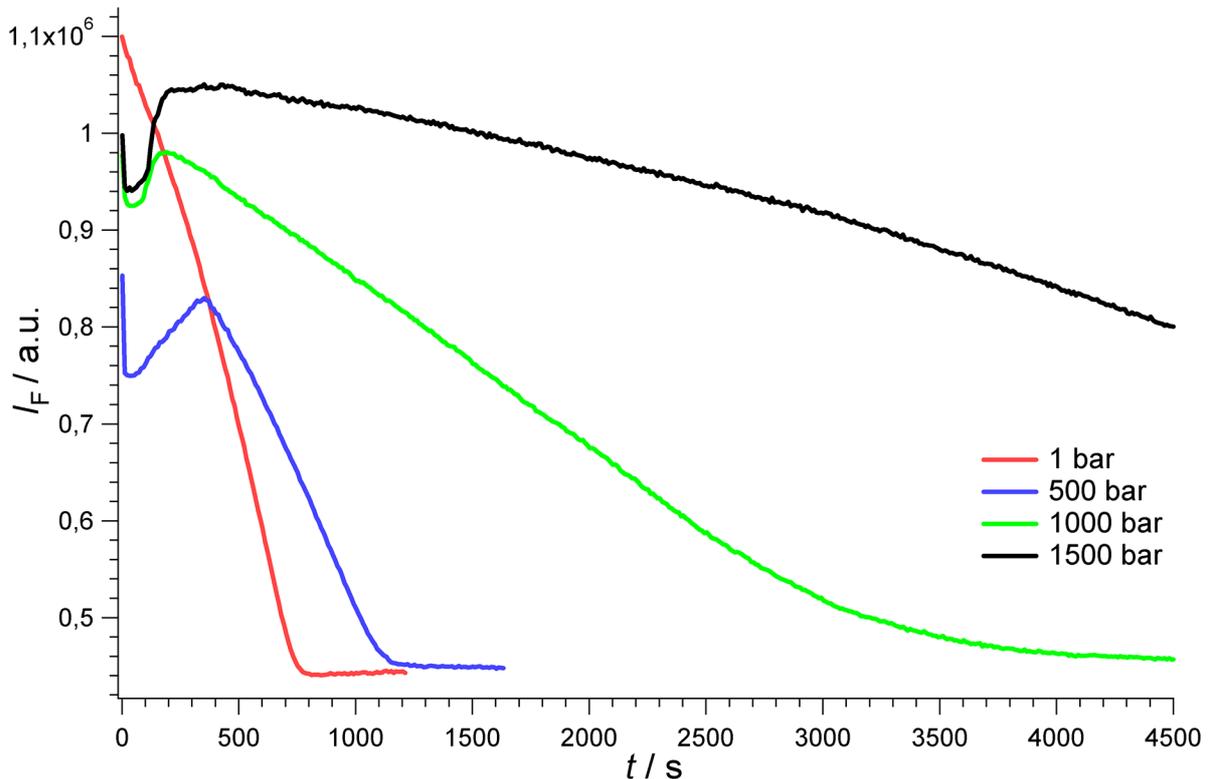


**Abbildung 5.33** Fluoreszenzbilder (in Falschfarben-Darstellung) des Einbau des N-Ras in DMPC/DSPC (1:1) bei  $T = 38\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## 5.7 Aktivitätsmessungen an der $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase

### 5.7.1 Plasmamembran-Fraktion

Die Aktivität der  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase als Funktion des Druckes wurde mit Hilfe der Messung der Abnahme der Fluoreszenzintensität des NADH bei 460 nm bestimmt. Abbildung 5.34 zeigt die Fluoreszenzintensität bei 37 °C für ausgewählte Drücke.

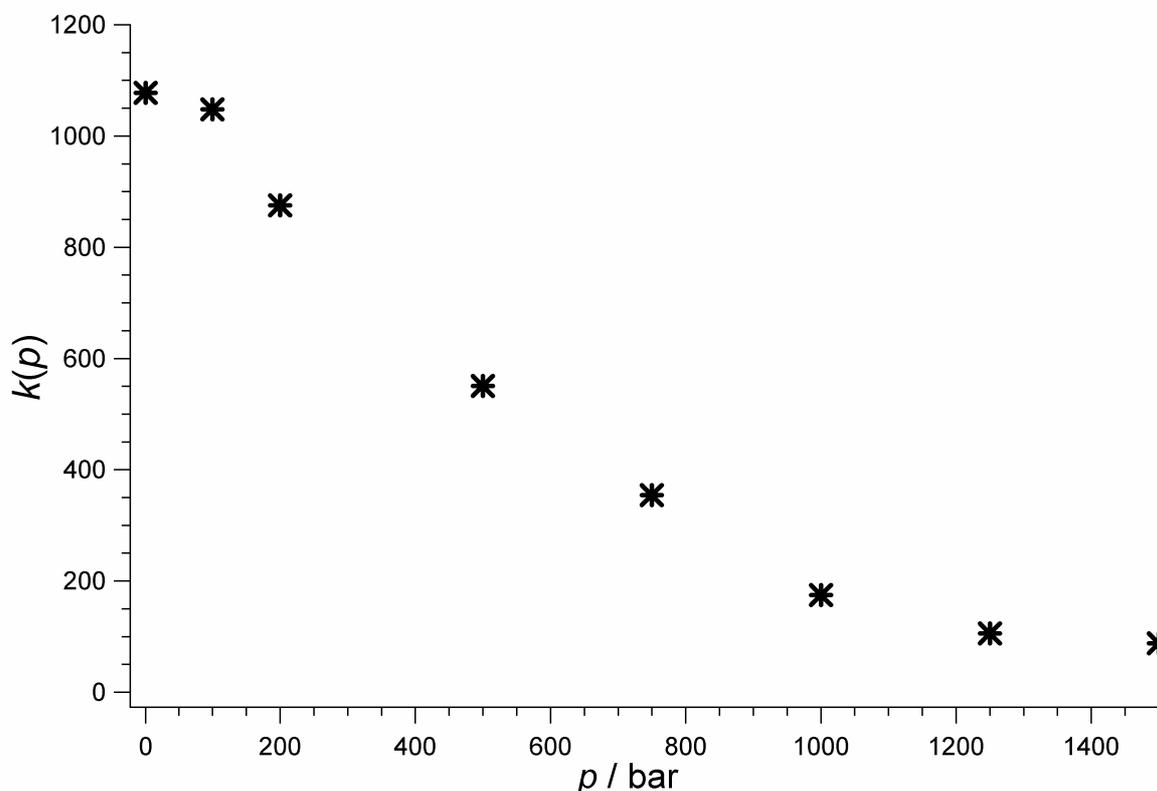


**Abbildung 5.34** Abnahme der Intensität der NADH-Fluoreszenz der  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase aus der Plasmamembran-Fraktion bei 460 nm bei verschiedenen Drücken.

Die Daten zeigen eine reversible Inaktivierung des Enzyms bis zu Drücken von 2 kbar, wobei die  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase ihre Aktivität durch eine 15 minütige Inkubation bei 1 bar wiedererlangt, auch nach einer Inkubation bei 2 kbar über einen Zeitraum von einer Stunde. Drücke größer als 2 kbar führen dagegen zu einer irreversiblen Inaktivierung des Enzyms.

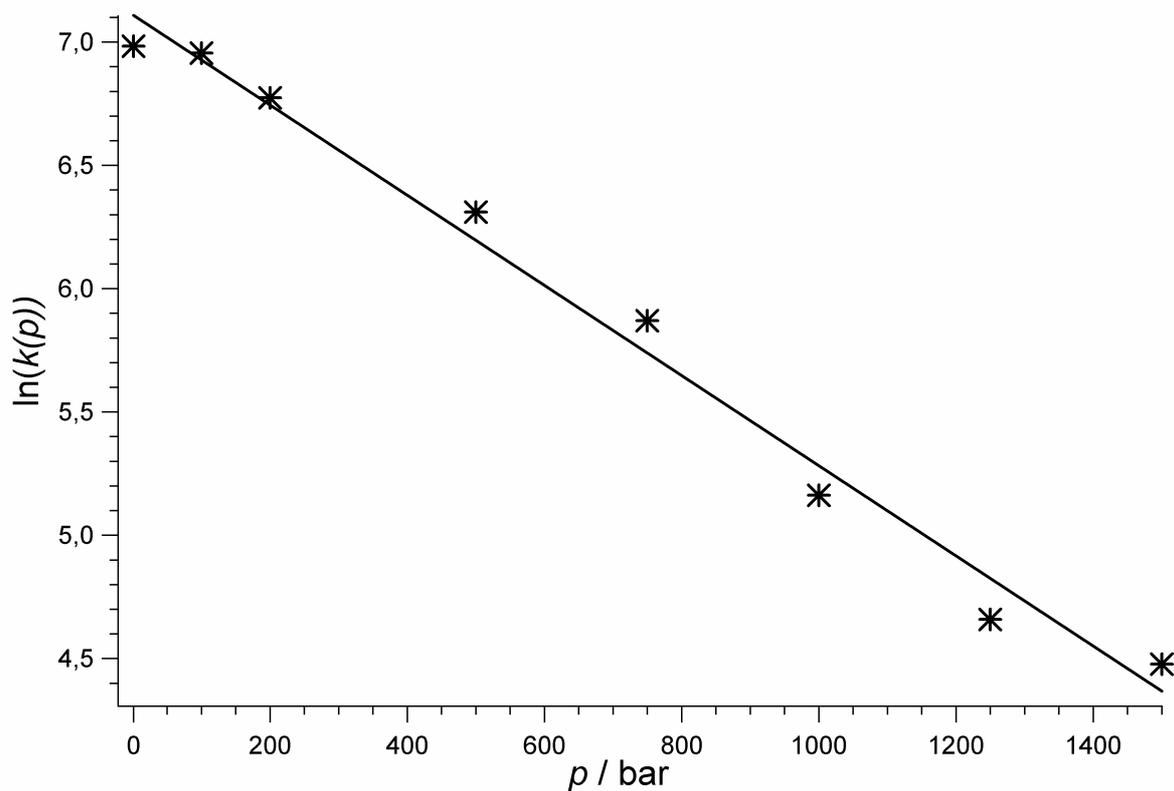
Der Verlauf der Intensität mit der Zeit ist sehr komplex und deutet auf eine Beteiligung von mehreren geschwindigkeitsbestimmenden Schritten an der druckinduzierten Reaktion hin. Dies ist jedoch nicht unerwartet, denn der Reaktionsmechanismus der  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase beinhaltet mehrere Zwischenreaktionen, die mit Volumenänderungen verbunden sind und somit empfindlich für den Einfluss von Druck sind.

In Abbildung 5.35 ist die Aktivität der Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase ( $k$ ) als Funktion des Druckes aufgetragen. Zur Bestimmung der Aktivität wurde in diesem Fall der lineare Bereich der Daten aus der Abbildung 5.34 verwendet.



**Abbildung 5.35** Die Aktivität  $k$  der Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase als Funktion des Druckes.

Die Auftragung von  $\ln(k)$  als Funktion des Druckes in Abbildung 5.36 ist im Wesentlichen linear und ermöglicht die Berechnung eines scheinbaren Aktivierungsvolumens der druckinduzierten Inaktivierungsreaktion von  $\Delta V^\ddagger = 47,1 \pm 2,3 \text{ mL mol}^{-1}$ . Dieses relativ große Aktivierungsvolumen kann wahrscheinlich nicht nur einem einzelnen chemischen Prozess zugeordnet werden; eine mögliche organische Modellreaktion für die Hydrolyse des ATP, die Hydrolyse des Dianions des Acetylphosphat, besitzt ein Aktivierungsvolumen von  $-19 \text{ mL mol}^{-1}$  [Penniston 1971].



**Abbildung 5.36** Logarithmische Auftragung von  $k$  als Funktion des Druckes.

Die erhaltenen Ergebnisse stimmen gut mit den Ergebnissen aus anderen Arbeitsgruppen überein [Kato 2002, Chong 1985]. Für eine weitergehende Untersuchung zur Aufklärung der Mechanismen der druckinduzierten Inaktivierung der Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase ist diese Probenpräparation jedoch nicht geeignet. Hierfür sind Messungen an wohldefinierten rekonstituierten Modellmembransystemen vonnöten.

### 5.7.2 SDS-aktivierte Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>ATPase

Die Aktivitätsmessungen an der SDS-aktivierten Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase führen zu demselben Ergebnis der Inaktivierung unter Druck wie die Messungen mit dem Enzym in der Plasmamembran-Fraktion. Mit Hilfe des Detergens SDS wurde bei der Präparation der Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase der Großteil der natürlichen Lipide entfernt. Bis zu einem Druck von 2 kbar ist die Inaktivierung reversibel, höhere Drücke führen zu einer irreversiblen Inaktivierung des Enzyms.

Der Mechanismus der Inaktivierung der Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase unter Druck ist noch weitestgehend ungeklärt. Mit Hilfe von Experimenten am rekonstituierten Enzym sollte es möglich sein die verschiedenen möglichen Ursachen für die Inaktivierung, wie z.B. die Änderung des Phasenzustandes der das Enzym umgebenden Lipide, gezielt untersuchen zu können. Voraussetzung dafür ist die Verfügbarkeit des Enzyms in einer sehr hohen Reinheit und auch in größeren Mengen. Damit wird es möglich, auch biophysikalische Methoden, wie z.B. die DSC, für Experimente zu verwenden, die im Vergleich zur Fluoreszenzspektroskopie und Fluoreszenzmikroskopie deutlich größere Mengen an biologischem Material benötigen. Eine große Bedeutung im Zusammenhang mit der Rekonstitution von Membranproteinen hat die DSC, denn mit ihrer Hilfe ist es möglich, z.B. die thermodynamischen Eigenschaften der Membran sowie des Membranproteins in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Lipidmatrix oder der Konzentration von Inhibitoren zu untersuchen.

Vorschriften zur Rekonstitution von Membranproteinen sind in der Literatur sehr zahlreich beschrieben, jedoch ist es von ganz entscheidender Bedeutung, die optimalen Parameter für jedes Membranprotein neu zu bestimmen, zumal sich die Literatur häufig auch nicht einig ist, welches Detergens für welches Protein nun wirklich am geeignetsten ist.

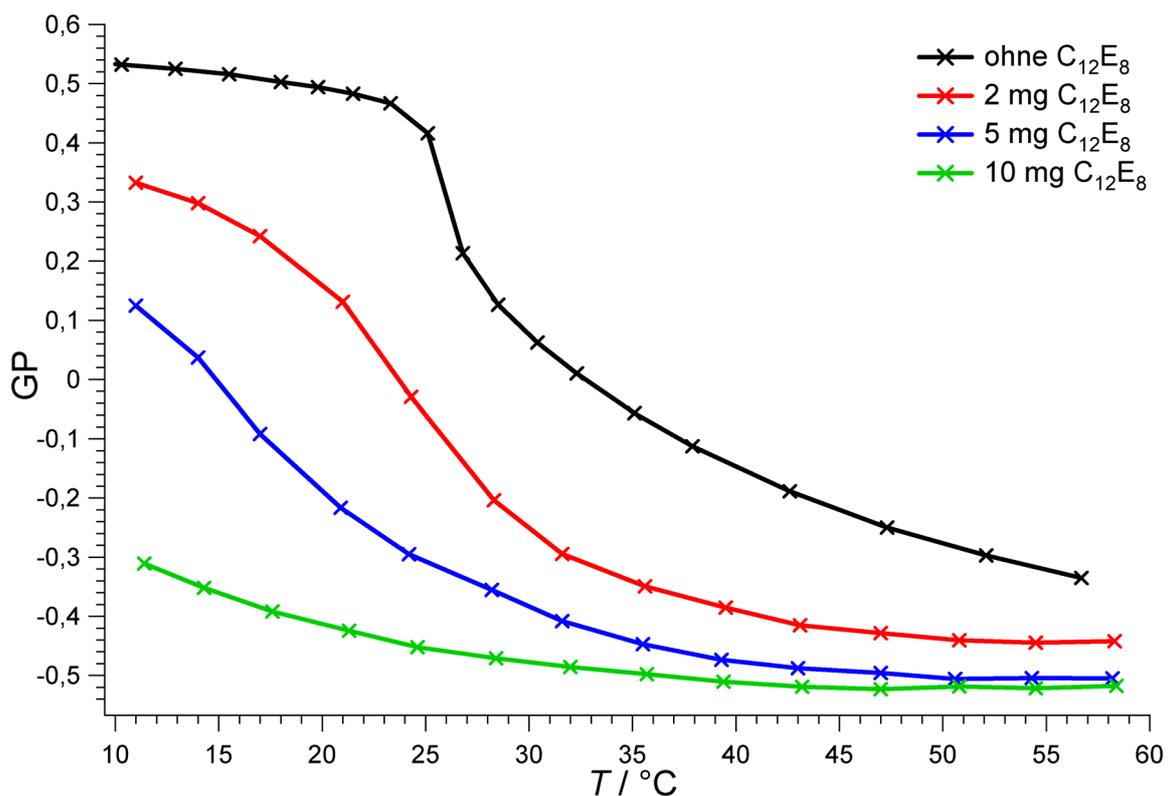
Ziel der in diesem Zusammenhang durchgeführten Experimente war es, die wesentlichen experimentellen Parameter für eine erfolgreiche Rekonstitution der Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase zu bestimmen und somit den Weg zu ebnen für eine umfassende weiterführende Untersuchung an diesem Membranprotein.

Der erste Schritt einer Rekonstitution ist die Gewinnung eines löslichen Proteins; die gebundenen Lipidmoleküle werden durch die Detergenmoleküle ersetzt und man erhält das solubilisierte Enzym. Wichtig dabei ist der Erhalt der Aktivität des Enzyms, da ansonsten häufig nach Durchführung der weiteren experimentellen Schritte ein System entsteht, in dem die Aktivität mit der ursprünglich vorliegenden biologischen Aktivität nicht mehr viel gemeinsam

hat. Für die Solubilisierung der  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase wird dazu überwiegend das Detergens  $\text{C}_{12}\text{E}_8$  verwendet.

Der zweite Schritt ist nun die Präparation der gewünschten Lipidmatrix für die Rekonstitution. Dazu wird das Lipid oder die Lipidmischung mit demselben Detergens wie bei der Solubilisierung des Enzyms verwendet, gemischt und somit die Bildung von Mizellen aus dem Detergens und den Lipidmolekülen bewirkt. Dieser Punkt ist von besonderer Bedeutung, da die richtige Menge an Detergens von großer Wichtigkeit für die Präparation ist. Eine zu geringe Menge an Detergens führt zu einer nicht vollständigen Zerstörung der Doppelschichtstruktur und somit zu Problemen bei der eigentlichen Rekonstitution. Eine zu große Menge führt zu Schwierigkeiten bei der Entfernung des Detergens im abschließenden Schritt.

Wir haben zunächst den Einfluss verschiedener Mengen an  $\text{C}_{12}\text{E}_8$  auf das Phospholipid DMPC mit Hilfe des Fluorophors LAURDAN untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.37 dargestellt.



**Abbildung 5.37** GP-Werte von DMPC mit verschiedenen Mengen an  $\text{C}_{12}\text{E}_8$  als Funktion der Temperatur.

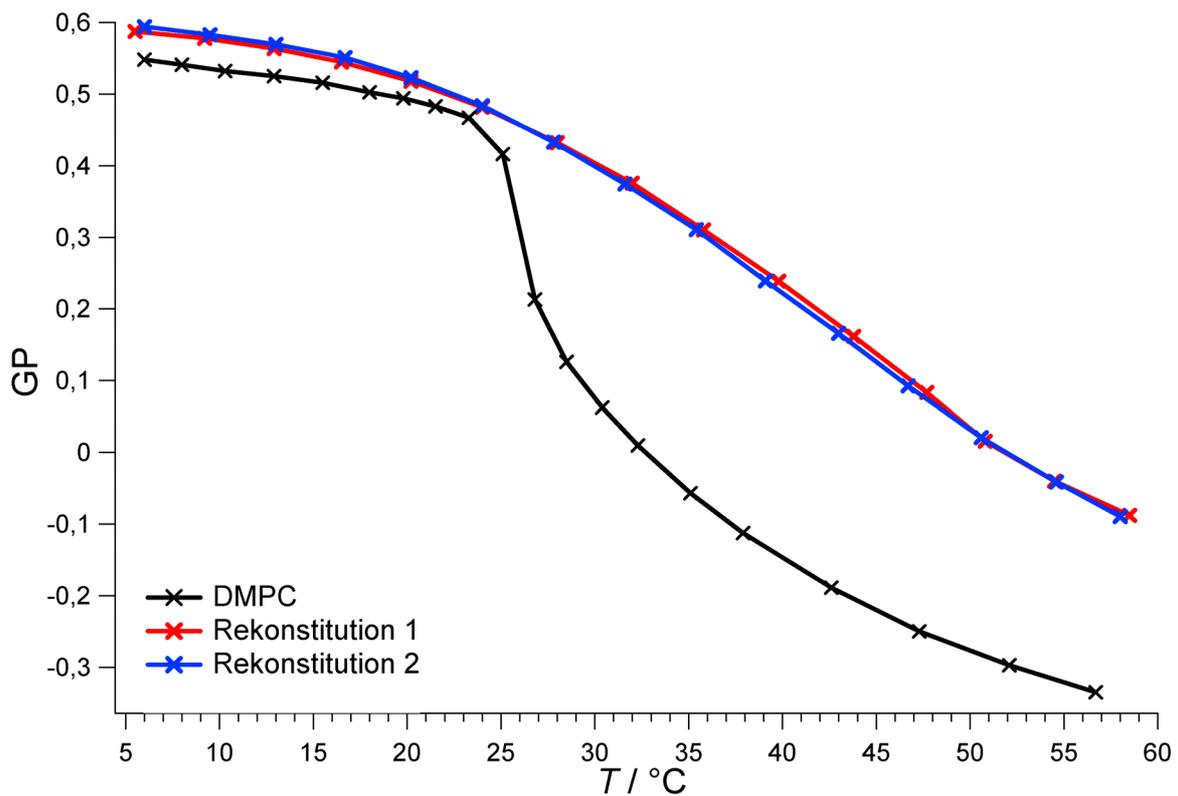
Abbildung 5.37 zeigt die GP-Werte von 2 mg DMPC als Funktion der Temperatur bei verschiedenen Konzentrationen an Detergens. Schon die Zugabe von 2 mg  $\text{C}_{12}\text{E}_8$  führt zu einer deutlichen Veränderung des Verlaufs der GP-Werte. Es kommt zu einer starken Absenkung der

GP-Werte mit steigender Detergensenkonzentration, welches auf die zunehmende Zerstörung der ursprünglichen Liposomen hinweist. Als Ergebnis aus diesen Messungen lässt sich festhalten, dass eine Menge von 5 mg C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> beim Einsatz von 2 mg DMPC vermutlich zur Bildung der gewünschten Mizellen ausreicht. Eine Zugabe von 10 mg führt zwar zu noch geringeren GP-Werten bei tiefen Temperaturen, jedoch ist bei einer Temperatur von 37 °C kaum eine weitere wesentliche Veränderung des GP-Wertes im Vergleich zur Probe mit 5 mg erkennbar.

Der dritte und letzte Schritt der Rekonstitution des Membranproteins ist das Entfernen des Detergens aus einer Mischung von solubilisiertem Enzym und den Lipid/Detergens-Mizellen. Zu diesem Zweck werden häufig Absorbermoleküle mit hydrophoben Oberflächen verwendet, an die das verwendete Detergens absorbiert. Die Reduzierung der Detergensenkonzentration unter den Wert der CMC führt zur Bildung von Liposomen aus dem eingesetzten Lipid, in die bei erfolgreicher Rekonstitution das Membranprotein eingebaut sind.

In Abbildung 5.38 ist das Ergebnis der ersten Rekonstitutionsversuche der Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase mit dem Lipid DMPC dargestellt. Aufgetragen sind die GP-Werte von LAURDAN in reinem DMPC und von LAURDAN in zwei DMPC-Proben nach jeweiliger Rekonstitution. Die maximale Konzentration an Enzym bei vollständigem Einbau beträgt 1 mol%.

Die GP-Werte der Probe aus reinem DMPC unterscheiden sich deutlich von den GP-Werten der Lipidproben der Rekonstitution. Bei tiefen Temperaturen kommt es zu einer leichten Erhöhung der GP-Werte, ähnlich wie im Falle des Einbaus von Cholesterol in DMPC/DSPC. Im Gegensatz zum reinen Lipid ist bei den Proben nach der Rekonstitution praktisch kein Phasenübergang mehr feststellbar, es kommt zu einer kontinuierlichen Abnahme des GP-Wertes. Selbst bei hohen Temperaturen bleibt der GP-Wert deutlich höher als beim DMPC. Die hohen GP-Werte bei tiefen Temperaturen sind ein Indiz dafür, dass das Detergens C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> vollständig entfernt wurde. Besonders erfreulich ist die sehr gute Reproduzierbarkeit dieses Experimentes (s. Abb. 5.38).



**Abbildung 5.38** GP-Werte von DMPC und DMPC/ $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase als Funktion der Temperatur.

Diese Ergebnisse verdeutlichen die erfolgreiche Durchführung einer Rekonstitution der  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase in die Lipidmatrix aus dem Phospholipid DMPC. Diese Messungen geben jedoch keine Aussagen über die Menge an eingebautem Enzym. Eine einfache qualitative Überprüfung der ATPase-Aktivität nach der Abzentrifugation der Liposomen ergab eine nur sehr geringe Aktivität im Überstand. Der größte Teil des Enzyms befindet sich also in den Liposomen. Maximal ist seine Konzentration 1 mol%; das entspricht einem Verhältnis von ungefähr 100 Lipidmolekülen auf ein Enzymmolekül.

Mit Hilfe der hier gewonnenen Erkenntnisse wird es nun möglich sein, weiterführende Untersuchungen zur Aufklärung des Mechanismus der druckinduzierten Inaktivierung der  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase mit Hilfe der Rekonstitution des Enzyms durchzuführen.

## 6 Zusammenfassung

Die Frage nach der Struktur und der lateralen Organisation von Lipiden und Proteinen in biologischen Membranen ist eines der aktuellen Forschungsgebiete der Biochemie und Biophysik. Die ungeheure Komplexität einer biologischen Membran aufgrund der großen Zahl unterschiedlicher Lipide und Proteine macht jedoch eine Untersuchung an realen biologischen Systemen sehr schwierig. Aus diesem Grund werden Modellbiomembranen verwendet, die nur aus zwei oder drei Lipidkomponenten bestehen, die die Untersuchung spezieller Aspekte der Wechselwirkung zwischen Lipiden und Proteinen ermöglichen sollen.

Die Fluoreszenzmikroskopie hat sich in den letzten Jahren zu einer hervorragenden Methode zur Beobachtung der lateralen Struktur von Lipiden in Membranen entwickelt. Mit Hilfe von GUV's in der Größenordnung von  $\sim 30 \mu\text{m}$  lassen sich Phasenseparationen und Domänenbildung in Bereich von Mikrometern direkt visualisieren. Der Einfluss verschiedener Zusätze auf die Membran kann somit untersucht werden.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde der Einfluss von Gramicidin, Cholesterol und verschiedenen lipidierten Peptiden auf das Phasenverhalten der Modellbiomembran DMPC/DSPC untersucht. Der zweite Teil beschäftigt sich mit der  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase, insbesondere mit der Druckinaktivierung des Enzyms.

### **Das System DMPC/DSPC/Gramicidin**

Gramicidin ist ein kleines Polypeptid mit 15 Aminosäuren und einer molekularen Masse von 1,8 kDa, das sich spontan in den hydrophoben Bereich der Lipiddoppelschicht einbaut. Durch den Einbau des Gramicidins in die Modellbiomembran DMPC/DSPC wird die Struktur der temperaturabhängigen Lipidphasen signifikant geändert. Im gel/fluid-Phasenkoexistenzgebiet werden in GUV's Domänen in der Größenordnung von Mikrometern beobachtet, die nach dem Einbau von GD vollständig verschwinden. Es kommt zu einer drastischen Abnahme der Konzentrationsfluktuationen nicht nur im Mikrometerbereich sondern auch im Nanometerbereich, wie durch SANS-Experimente gezeigt werden konnte. Die Lipidmatrix hat hier auch einen entscheidenden Einfluss auf die Konformation des eingebauten Peptids. Untersuchungen mit Hilfe der FTIR-Spektroskopie konnten zeigen, dass das Gleichgewicht zwischen doppelhelikalen und helikalen Dimerstrukturen des Gramicidins abhängig vom Phasenzustand und von der Länge der Kohlenwasserstoffkette der Lipidmoleküle ist. Die molekulare Lipidumgebung hat einen erheb-

lichen Einfluss auf die Stabilität und die Struktur des Polypeptids. Durch einen effektiven molekularen Sortiermechanismus kann ein großes „Hydrophobic Mismatch“ in der Lipidmischung DMPC/DSPC vermieden werden. Dies führt zu beträchtlichen Veränderungen in der Lipidstruktur und in der Konformation des Polypeptids.

### **Das System DMPC/DSPC/Cholesterol**

Cholesterol ist eine wichtige Komponente biologischer Membranen, denn es ist maßgeblich für die Stabilität, Struktur und Dynamik der Lipiddoppelschichten verantwortlich. Durch den Einbau von Cholesterol ist es möglich, den Ordnungsparameter der Lipide, die Kettenlänge und die Packungsdichte in den Lipidphasen zu ändern. Der Einbau von 20 mol% Cholesterol in die Modellbiomembran DMPC/DSPC bewirkt die Ausbildung einer fluiden geordneten  $L_O$ -Phase. Dies führt zur Reduzierung der großen Konzentrationsfluktuationen und damit zur Verringerung der gel/fluid-Phasenkoexistenz. Cholesterol baut sich bevorzugt in die DMPC-reichen Regionen der Membran ein. Ab einer Cholesterol-Konzentration  $> 33$  mol% ist ein Phasenübergang im Lipidsystem kaum noch detektierbar.

### **Das System DMPC/DSPC/lipidiertes Peptid bzw. Protein**

Lipidierte Peptide spielen eine große Rolle bei membranassoziierten Prozessen, wie der Signaltransduktion. Hierzu gehören die Mitglieder aus der Familie der Ras-Proteine, die über eine Lipidmodifizierung die Fähigkeit zur Anlagerung an Lipiddoppelschichten erlangen. Der Einbau unterschiedlich lipidierter Peptide in die Modellmembran DMPC/DSPC wurde mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie und der Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Die hier verwendeten Peptide mit den unterschiedlichen Ankersystemen bauen sich alle bevorzugt in die fluide DMPC-reiche Phase der Mischung ein, die Art der Lipidmodifizierung spielt in diesem Fall keine Rolle.

Mit der Fluoreszenzmikroskopie an GUV's ist es prinzipiell möglich, auch den Einbau vollständiger aktiver Proteine in die Lipidmatrix zu untersuchen, wie am Beispiel des verwendeten Ras-Proteins gezeigt werden konnte. Daraus ergeben sich sehr interessante Möglichkeiten zur Untersuchung bei der Verfügbarkeit der entsprechenden biologischen Substanzen.

### **Das System DMPC/DSPC/Cholesterol/BL2**

Wie schon erwähnt, führt der Einbau von Cholesterol in die DMPC/DSPC-Membran zur Ausbildung einer fluiden geordneten  $L_O$ -Phase. Diese Lipidphase hat eine große Bedeutung in der aktuellen Diskussion um die „lipid rafts“, denen eine wichtige Rolle bei der lokalen Aufkonzentrie-

rung von Membranproteinen zugeschrieben wird. Der Einbau des Peptids BL2, palmitoyliert und farnesyliert, in das Lipidsystem DMPC/DSPC/20 mol% Cholesterol bewirkt eine Phasenseparation, bei der es aufgrund der hohen Affinität des Peptids zur Ausbildung einer DMPC-reichen fluiden Phase kommt. Bei tiefen Temperaturen, d.h. im Bereich der Gelphasen, ist eine effektive Sortierung nicht mehr möglich und es kommt zur Aggregation der Peptide und damit zur Dimerbildung der BODIPY-gelabelten Moleküle. Als Ergebnis kann festgehalten werden, dass Peptide mit dem hier vorliegenden Motiv der Lipidmodifizierung keine Assoziation mit fluiden geordneten oder gelartigen Domänen in phasenseparierten Lipidmembranen bevorzugen und es somit wahrscheinlich auch nicht zum Einbau in die „lipid rafts“ natürlicher Systeme kommen dürfte.

### **Die Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase**

Das Enzym Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase ist der Schlüssel für die Gradienten von Na<sup>+</sup> und K<sup>+</sup> entlang biologischer Membranen von eukaryotischen Zellen. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Präparationen und Experimente sind die ersten wichtigen Schritte auf dem Weg zur Aufklärung des Mechanismus der Druckinaktivierung des Enzyms. Eine präparierte Plasmamembranfraktion mit dem angereicherten Enzym diente zum Aufbau eines Systems zur Messung der ATPase-Aktivität des Enzyms als Funktion des Drucks. Eine reversible Inaktivierung des Enzyms bis zu einem Druck von 2 kbar konnte ermittelt werden. Mit Hilfe der SDS-aktivierten Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase, bei der der Großteil der natürlichen Membranlipide durch das Detergens SDS entfernt wurde, ist es nun möglich, durch gezielte Aktivitätsmessungen am rekonstituierten Enzym einen eventuellen Zusammenhang einer druckinduzierten Phasenumwandlung in der Lipidmatrix mit dem Verlust der Aktivität des Enzyms aufzuzeigen. Mit Hilfe quantitativer Western-Blots ist es möglich, die genaue Menge an eingebautem Enzym zu bestimmen. Die Methode der dynamischen Lichtstreuung kann helfen, Informationen über die Größe der gebildeten Vesikel zu bekommen, die sehr wichtig für die weiteren Aktivitätsmessungen sind. Bei sehr kleinen Vesikeln ( $\varnothing \sim 30$  nm) sind die Konzentrationen an ATP und den weiteren Komponenten im Inneren des Vesikels so gering, dass es schon nach kurzer Zeit zu einem Stop der Reaktion kommt; die Aktivität kann nur über einen sehr kleinen Zeitraum verfolgt werden. In diesem Fall müsste auf Kanalbildner wie Gramacidin und Valinomycin in Verbindung mit einem Detergens zurückgegriffen werden.

Auch die Fluoreszenzmikroskopie kann dazu verwendet werden, Informationen über den Einbau der Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase in die Lipidmatrix zu bekommen. Dazu ist es z.B. möglich, das Enzym selber zu markieren oder das eingebaute Enzym durch ein BODIPY-markiertes Ouabain-Molekül in der Membran zu detektieren. Voraussetzung für alle in der Zukunft geplanten biophysikalischen

---

Messungen ist jedoch die Verfügbarkeit einer ausreichenden Menge an biologischem Material mit einer hohen Reinheit. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Präparation der SDS-aktivierten  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase bietet ausreichend Material für die geplanten Experimente sowie die Möglichkeit, neues Material mit identischen Eigenschaften durch eine weitere Präparation zu erhalten.

## 7 Literatur

- [Alleva 1995] Alleva, R., Ferretti, G., Borghi, B., Pignotti, E., Bassi, A., Curatola, G. (1995), *Transfus. Sci.* 16, No. 3, 291-297.
- [Almeida 1993] Almeida, P.F.F., Vaz, W.L.C., Thompson, T.E. (1993), *Biophys. J.* 64, 399-412.
- [Aloia 1993] Aloia, C., Tian, H., Jensen, F.C. (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 5181-5185.
- [Angelova 1986] Angelova, M. I., and Dimitrov, D. S. (1986). *Faraday Discuss. Chem. Soc.* 81, 303-311.
- [Angelova 1992] Angelova, M. I., Sole'au, S., Mele'ard, Ph., Faucon, J. F., Bothorel, P. (1992), *Prog. Colloid Polym. Sci.* 98, 127-131.
- [Arseniev 1985] Arseniev, A. S., Barsukov, I. L., Bystrov, V. F., Lomize, A. L., Ovchinnikov, Y. A. (1985), *FEBS Lett.* 186, 168-174.
- [Artigas 2003] Artigas, P. and Gadsby, D.C. (2003), *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 501-505.
- [Bagatolli 1999] Bagatolli, L.A., and Gratton, E. (1999), *Biophys. J.* 77, 2090-2101.
- [Bagatolli 2000] Bagatolli, L.A., and Gratton, E. (2000), *Biophys. J.* 78, 290-305.
- [Bagatolli 2001] Bagatolli, L.A., and Gratton, E. (2001), *Biophys. J.* 79, 434-447.
- [Bagatolli 2003] Bagatolli, L.A. (2003), *Chem. Phys. Lip.* 122, 137-145.
- [Bai 1997] Bai, J., Pagano, R.E. (1997), *Biochemistry* 36, 8840-8848.
- [Bandeekar 1992] Bandeekar, J. (1992), *Biochim. Biophys. Acta* 1120, 123-143.
- [Bergstroem 2002] Bergstroem, F., Mikhalyov, I., Hagglof, P., Wortmann, R., Ny, T., Johansson, L. B.-A. (2002), *J. Am. Chem. Soc.* 124, 196-204.
- [Börger 2001] Börger, M. (2001), Dissertation, *Universität Dortmund*.
- [Bouchard 1993] Bouchard, M., and Auger, M. (1993), *Biophys. J.* 65, 2484-2492.
- [Bultmann 1991] Bultmann, T., Vaz, W. L. C., Melo, E. C. C., Sisk, R. S., Thompson, T. E. (1991), *Biochemistry* 30, 5573-5579.
- [Burkhart 1998] Burkhart, B. M., Gassman, R. M., Langs, D. A., Pangborn, W. A., Duax, W. L. (1998), *Biophys. J.* 75, 2135-2146.
- [Burkhart 1999] Burkhart, B. M., Gassman, R. M., Langs, D. A., Pangborn, W. A., Duax, W. L., Pletnev, V. (1999), *Biopolymers* 51, 129-144.
- [Byler 1986] Byler, D. M., and Susi, H. (1986), *Biopolymers* 25, 469-487.

- [Campos 1995] Campos, A.M., Abuin, E.B., Lissi, E.A. (1995), *Coll. Surf. A: Phys. Engin. Asp.* 100, 155-161.
- [Chapman 1995] Chapman, C. F., Liu, Y., Sonek, G. J., Tromberg, B. T. (1995), *Photochem. Photobiol.* 62, 416-425.
- [Chong 1985] Chong, P. L.-G., Fortes, P. A. G. and Jameson, D. M. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 14484-14490.
- [Chow 1995] Chow, D.C. and Forte, J.G. (1995), *Journal of Exp. Biol.* 198, 1-17.
- [Cornelius 2001] Cornelius, F. (2001), *Biochemistry* 40, 8842-8851.
- [Cornell 1988] Cornell, B. A., Separovic, F., Baldassi, A. J., Smith, R. (1988), *Biophys. J.* 53, 67-76.
- [Cornell 1989] Cornell, B. A., Separovic, F., Thomas, D. E. , Atkins, A. R., Smith, R. (1989), *Biochim. Biophys. Acta* 985, 229-232.
- [Cross 1997] Cross, T. A. (1997), *Methods Enzymol.* 289, 672-696.
- [Curran 1999] Curran, A.R., Templer, R.H., Booth, P.J. (1999), *Biochemistry* 38, 9328-9336.
- [Czeslik 1997] Czeslik, C., Erbes, J., Winter, R. (1997), *Europhys. Lett.* 37, 577-582.
- [Dahim 2002] Dahim, M., Mizuno, N.K., Li, X-M., Momsen, W.E., Momsen, M.M., Brockman, H.L. (2002), *Biophys. J.* 83, 1511-1524.
- [Davies 2001] Davies, S. M. A., Epand, R. M., Kraayenhof, R., Cornell, R. B. (2001), *Biochemistry.* 40, 10522–10531.
- [de Smedt 1979] de Smedt, H., Borghgraef, R., Ceuterick, F., Heremans, K. (1979), *Biochim. Biophys. Acta* 556, 479-489.
- [Dimitrov 1987] Dimitrov, D. S., and Angelova, M. J. (1987), *Prog. Colloid Polym. Sci.* 73, 48-56.
- [Doyle 1997] Doyle, D.A. and Wallace, B.A. (1997), *J. Mol. Biol.* 266, 963-977.
- [Drummen 2002] Drummen, G.P.C., van Liebergen, L.C.M., Op den Kamp, J.A.F., Post, J.A. (2002), *Free Radical Biology & Medicine* 33, 473-490.
- [Dumas 1997] Dumas, F., Sperotto, M. M., Lebrun, M.-C., Tocanne, J.-F., Mouritsen, O. G. (1997), *Biophys. J.* 73, 1940-1953.
- [Edidin 2003] Edidin, M. (2003), *Nature* 4, 414-418.
- [Eftink 1991a] Eftink, M.R. (1991), *Biophysical Biochemical Aspects of Fluorescence Spectroscopy*, T. G. Dewey (ed.), Plenum Press, New York.
- [Eftink 1991b] Eftink, M.R. (1991), *Topics in Fluorescence Spectroscopy*, J.R. Lakowicz (ed.), Plenum Press, New York, 53.

- [Estra-Lopis 2000] Estrela-Lopis, I., Brezesinski, G., Möhwald, H. (2000), *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2, 4600-4604.
- [Fahsel 2002] Fahsel, S., Pospiech, E.-M., Zein, M., Hazlett, T.L., Gratton, E., Winter, R. (2002) *Biophys. J.* 83, 334-344.
- [Fiske 1925] Fiske, C.H. and Subbarow, Y. (1925) *J. Biol. Chem.* 66, 375-388.
- [Gabbianelli 1996] Gabbianelli, R., Falcioni, G., Mazzanti, L., Bertoli, E., Zolese, G. (1996), *Comp. Biochem. Physiol.* 144, 275-279.
- [Garda 1997] Garda, H. A., Bernasconi, A.M., Brenner, R. R., Aguilar, F., Soto, M. A., Sotomayor, C.P. (1997), *Biochim. Biophys. Acta* 1323, 97-105.
- [Geyer 1997] Geyer, M. and Wittinghofer, A. (1997) *Curr. Op. Struct. Biol.* 7, 786-792.
- [Gil 1998] Gil, T., Ipsen, J. H., Mouritsen, O. G., Sabra, M. C., Sperotto, M. M., Zuckermann, M. J. (1998), *Biochim. Biophys. Acta* 1376, 245-266.
- [Glis 1998] Glis, C., Clausen-Schaumann, H., Günther, R., Odenbach, S., Randl, O., Bayerl, T. M. (1998), *Biophys. J.* 74, 2443-2450.
- [Glitsch 2001] Glitsch, H.G. (2001), *Physiological Reviews* 81, 1791-1826.
- [Glynn 1985] Glynn, I.M. (1985) *The Enzymes Of Biological Membranes* 2<sup>nd</sup> Edition, Martonosi (Ed.), Plenum Press, NY.
- [Grell 2001] Grell, E., Schick, E., Lewitzki, E. (2001), *Thermochimica Acta* 380, 245-254.
- [Grinberg 2001] Grinberg, A.V., Gevondyan, N.M., Grinberg, N.V., Grinberg, V.Y. (2001), *Eur. J. Biochem.* 268, 5027-5036.
- [Hancock 2003] Hancock, J. F. (2003), *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 373-383.
- [Harroun 1999a] Harroun, T.A., Heller, W.T., Weise, T.M., Yang, L., Huang, H.W. (1999), *Biophys. J.* 76, 937-945.
- [Harroun 1999b] Harroun, T.A., Heller, W.T., Weise, T.M., Yang, L., Huang, H.W. (1999), *Biophys. J.* 76, 3176-3185.
- [Heerklotz 2003] Heerklotz, H., Szadkowska, H., Anderson, T., Seelig, J. (2003), *Biophys. J.* 329, 793-799.
- [Heimburg 1997] Heimburg, T., Esmann, M., Marsh, D. (1997), *J. Biol. Chem.* 272, 25685-25692.
- [Hinderliter 2001] Hinderliter, A., Almeida, P. F. F., Creutz, C. E., Biltonen, R. L. (2001), *Biochemistry.* 40, 4181-4191.

- [Huang 1999] Huang, J., Buboltz, T., Feigenson, G.W. (1999), *Biochim. Biophys. Acta* 1417, 89-100.
- [Hunt 1997] Hunt, J. F., McCrea, P. D., Zaccai, G., Engelman, D. M. (1997), *J. Mol. Biol.* 273, 1004-1019.
- [Jørgensen 1993] Jørgensen, K., Sperotto, M. M., Mouritsen, O. G., Ipsen, J. H., Zuckermann, M. J. (1993), *Biochim. Biophys. Acta* 1152, 135-145.
- [Jørgensen 1995] Jørgensen, K., and Mouritsen, O. G. (1995), *Biophys. J.* 95, 942-954.
- [Jørgensen 2000] Jørgensen, K., Klinger, A., Biltonen, R. L. (2000), *J. Phys. Chem. B* 104, 11763-11773.
- [Kato 2002] Kato, M., Hayashi, R., Tsuda, T., Tanaguchi, K. (2002), *Eur. J. Biochem.* 269, 110-118.
- [Kemp 1972] Kemp, G., Jacobson, K.A., Wenner, C.E. (1972), *Biochim. Biophys. Acta* 255, 493-501.
- [Ketchum 1997] Ketchum, R.R., Roux, B., Cross, T.A. (1997), *Structure* 5, 1655-1669.
- [Killian 1988] Killian, J.A., Nicholson, L.K., Cross, T.A. (1988), *Biochim. Biophys. Acta* 943, 535-540.
- [Killian 1992] Killian, J. A. (1992), *Biochim. Biophys. Acta.* 1113, 391-425.
- [Killian 1998] Killian, J.A. (1998), *Biochim. Biophys. Acta* 1376, 401-416.
- [Koeppel 1996] Koeppel II., R. E., and Andersen, O. S. (1996), *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 25, 231-258.
- [Korlach 1999] Korlach, J., Schwille, P., Webb, W.W., Feigenson, G.W. (1999), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 8461-8466.
- [Kovacs 1999] Kovacs, F., Quine, J., Cross, T.A. (1999), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 7910-7915.
- [Lakowicz 1999] Lakowicz, J.R. (1999), *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 2<sup>nd</sup> Ed., Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- [Landwehr 1994] Landwehr, A., and Winter, R. (1994), *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* 98, 214-218.
- [Langs 1991] Langs, D. A., Smith, G. D., Courseille, C., Pre'cigoux, G. (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88, 5345-5349.
- [Leidy 2001] Leidy, C., Wolkers, W. F., Jorgensen, K., Mouritsen, O. G., Crowe, J. H. (2001), *Biophys. J.* 80, 1819-1828.
- [Levi 1993] Levi, M., Wilson, P. V., Cooper, O. J., Gratton, E. (1993), *Photochem. Photobiol.* 57, 420-425.

- [Levi 1997] Levi, M., Wilson, P., Nguyen, S., Iorio, E., Sapora, O., Parasassi, T. (1997), *Mechan. Ageing Developm.* 97, 109-115.
- [Lipowsky 1995] Lipowsky, R., and Sackmann, E., editors (1995), *Structure and Dynamics of Membranes*, Vols. 1A, 1B. Elsevier, Amsterdam.
- [Lisi 1993] Lisi, A., Pozzi, D., Grimaldi, S. (1993), *Membrane Biochemistry* 10, 203-212.
- [Löffler 1998] Löffler, G., Petrides, P.E. (1998), *Biochemie und Pathobiochemie*, 6. Auflage, Springer, Berlin.
- [Lowry 1951] Lowry, O.H. Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall. R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- [Ludolph 2003] Ludolph, B., Waldmann, H. (2003), *Chem. Eur. J.* 9, 3683-3691.
- [Mabrey 1976] Mabrey, S., Sturtevant, J. M. (1976), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 3862-3866.
- [Magee 1999] Magee, T. , Marshall, C. (1999) *Cell* 98, 9-12.
- [May 2000] May, S., and Ben-Shaul, A. (2000), *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2, 4494-4502.
- [Mercer 1993] Mercer, R.W. (1993) *Int. Rev. Cyt.* 137, 139-168.
- [Morrow 1991] Morrow, M. R., Srinivasan, R., Grandal, N. (1991), *Chem. Phys. Lip.* 58, 63-72.
- [Mouritsen 1993] Mouritsen, O.G. and Bloom, M. (1993), *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 22, 145-171.
- [Munro 2003] Munro, S. (2003), *Cell* 115, 377-388.
- [Naik 1986a] Naik, V. M., and Krimm, S. (1986), *Biophys. J.* 49, 1131-1145.
- [Naik 1986b] Naik, V. M., and Krimm, S. (1986), *Biophys. J.* 49, 1147-1154.
- [Nielsen 2000] Nielsen, L. K., Vishnyakov, A., Jørgensen, K., Bjornholm, T., Mouritsen, O. G. (2000), *J. Phys. Condens. Matter* 12, 309-314.
- [Palleschi 1996] Palleschi, S., Silvestroni, L. (1996), *Biochim. Biophys. Acta* 1279, 197-202.
- [Parasassi 1990] Parasassi, T., De Stasio, G., d'Ubaldo, A., Gratton, E. (1990), *Biophys. J.* 57, 1179-1186.
- [Parasassi 1991] Parasassi, T., De Stasio, G., Ravagnan, G., Rusch, R. M., Gratton, E. (1991), *Biophys. J.* 60, 179-189.
- [Parasassi 1992] Parasassi, T., Gratton, E. (1992), *Journal of Fluorescence* 2, 167-174.

- [Parasassi 1994] Parasassi, T., Stefano, M.D., Loiero, M., Ravagnan, G., Gratton, E. (1994), *Biophys. J.* 66, 120.
- [Parasassi 1994a] Parasassi, T., Stefano, M.D., Loiero, M., Ravagnan, G., Gratton, E. (1994), *Biophys. J.* 66, 763.
- [Parasassi 1995] Parasassi, T., Gratton, E. (1995), *Journal of Fluorescence* 5, 59-69.
- [Parasassi 1997] Parasassi, T., Gratton, E., Yu, W., Wilson, P., Levi, M. (1997), *Biophys. J.* 72, 2413-2429.
- [Pascal 1993] Pascal, S. M., and Cross, T. A. (1993), *J. Biomol. NMR.* 3, 495-513.
- [Penniston 1971] Penniston, J.T., (1971), *Arch. Biochem. Biophys.* 142, 322-332.
- [Porter 1996] Porter, J. A. , Young, K. E. , Beachy, P. A. (1996), *Science* 274, 255-259.
- [Pozzi 1996] Pozzi, D., Lisi, A., Lanzilli, G., Grimaldi, S. (1996), *Biochim. Biophys. Acta* 1280, 161-168.
- [Quist 1998] Quist, P.-O. (1998), *Biophys. J.* 75, 2478-2488.
- [Reeves 1973] Reeves, J.P., Dowben, R.M. (1973), *J. Cell. Biol.* 49.
- [Rendell 1987] Rendell, D. (1987), *Fluorescence and Phosphorescence*, John Wiley & Sons, New York.
- [Resh 1999] Resh, M. D. (1999), *Biochim. Biophys. Acta* 1451, 1-16.
- [Roy 1999] Roy, S. , Luetterforst, R. , Harding, A. , Apolloni, A. , Etheridge, M., Stang, E., Rolls, B. , Hancock, J. F. , Parton, R. G. (1999) *Nature Cell Biology* 1, 98-105.
- [Sankaram 1992] Sankaram, M. B., and Thompson, T. E. (1992), *Biochemistry* 31, 8258-8268.
- [Sankaram 1994] Sankaram, M. B., Marsh, D., Gierasch, L. M., Thompson, (1994), *Biophys. J.* 66, 1959-1968.
- [Sarges 1965] Sarges, R. and Witkop, B. (1965), *J. Am. Chem. Soc.* 87, 2011-2020.
- [Schram 1997] Schram, V., Thompson, T.E. (1997), *Biophys. J.* 72, 2217-2225.
- [Shahinian 1995] Shahinian, S. and Silvius, J. R. (1995), *Biochemistry* 34, 3813-3822.
- [Silvius 2003] Silvius, J.R. (2003), *Biochim. Biophys. Acta* 1610, 174-183.
- [Simons 1997] Simons, K., and Ikonen, E. (1997), *Nature* 387, 569-572.
- [Sinensky 2000] Sinensky, M. (2000), *Biochim. Biophys. Acta* 1484, 93-106.
- [Singer 1972] Singer, S.J., and Nicolson, G.L. (1972), *Science* 175, 720-731.
- [So 1995] So, P. T. C., French, T., Yu, W. M., Berland, K. M., Dong, C. Y., Gratton, E. (1995), *Bioimaging* 3, 49-63.

- [Sowa 2001] Sowa, G. , Pypaert, M. , Sessa, W. C. (2001), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 14072-14077.
- [Sugar 1999] Sugar, I. P., Thompson, T.E., Biltonen, R.L. (1999), *Biophys. J.* 76, 2099-2110.
- [Sychev 1993] Sychev, S. V., Barsukov, L. I., Ivanov, V. T. (1993), *Eur. Biophys. J.* 22, 279-288.
- [Tapia 1998] Tapia, J.C., Aguilar, L.F., Sotomayor, C.P., Aguayo, L.G. (1998), *Europ. J. Pharmac.* 354, 239-245.
- [Therien 1999] Therien, A.G., Karlsh, S.J., Blostein R. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 12252-12256.
- [Tsien 1998] Tsien, R.Y. (1998), *Ann. Rev. Biochem.* 67, 509-544.
- [Ulmer 2002] Ulmer, H. M., Herberhold, H., Fahsel, S., Gänzle, M. G., Winter, R., Vogel, R. F. (2002), *Applied and Environmental Microbiology* 68, 1088-1095.
- [Urry 1971] Urry, D.U. (1971), *Proc. Natl. Acad. Sci.* 68, 672-667.
- [van der Goot 2001] van der Goot, F. G., and Harder, T. (2001), *Semin. Immunol.* 13, 89-97.
- [van Meer 1989] van Meer, G. (1989), *Annu. Rev. Cell Biol.* 5, 247-275.
- [Veatch 1974] Veatch, W. R., Fossel, E. T., Blout, E. R. (1974), *Biochemistry* 13, 5249-5256.
- [Wallace 1986] Wallace, B.A. (1986), *Biophys. J.* 49, 295-306.
- [Wallace 1990] Wallace, B.A. (1990), *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 19, 127-157.
- [Wallace 1998] Wallace , B.A. (1998), *J. Struct. Biol.* 121, 123-141.
- [Wang 2001] Wang, T.-Y., Leventis, R., Silvius, J.R. (2000), *Biophys. J.* 79, 919-933.
- [Wang 2002] Wang, T.-Y., Leventis, R., Silvius, J.R. (2001), *Biochemistry* 40, 13031-13040.
- [Weber 1979] Weber, G., Farris, F. J. (1979), *Biochemistry* 18, 3075-3078.
- [Wilson 1997] Wilson, H.A., Huang, W., Waldrip, J.B., Judd, A.M., Vernon, L.P., Bell, J.D. (1997), *Biochim. Biophys. Acta* 1349, 142-148.
- [Winter 1999] Winter, R., Gabke, A., Czeslik, C., Pfeifer, P. (1999), *Phys. Rev. E* 60, 7354-7359.
- [Winter 2002] Winter, R. (2002), *Proceedings of the Internat. School of Physics*, 413-453.
- [Wittinghofer 2000] Wittinghofer, A., and Waldmann, H. (2000), *Angew. Chem., Int. Ed.* 39, 4193-4214.

- 
- [Yu 1996] Yu, W., So, P. T. C., French, T., Gratton, E. (1996), *Biophys. J.* 70, 626-636.
- [Zacharias 2002] Zacharias, D.A., Violin, J.D., Newton, A.C., Tsien, R.Y. (2002), *Science* 296, 913-916.
- [Zein 2000] Zein, M., and Winter, R. (2000), *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2, 4545-4551.
- [Zeng 1995] Zeng, J., and Chong, P. L-G. (1995), *Biophys. J.* 68, 567-573.
- [Zhang 1996] Zhang, F. L. , Casey, P. J. (1996), *Annu. Rev. Biochem.* 65, 241-269.
- [Zubiri 1999] Zubiri, D., Domecq, A., Bernik, D.L. (1999), *Coll. Surf. B: Biointerfaces* 13, 13-28.



# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name: Sascha Janosch, geb. Fahsel  
Geburtsdatum: 04. Juli 1973  
Geburtsort: Hagen  
Nationalität: deutsch  
Familienstand: verheiratet

## Schulbildung

1980 – 1984: Freiherr-vom-Stein-Grundschule in Hagen  
1984 – 1993: Fichte-Gymnasium in Hagen mit dem Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife

## Wehrdienst

1993 – 1994: Wehrdienst beim 5. Stabs- und Fernmeldebataillon als Fernmelder in Düsseldorf

## Studium

WS 1994/95 – SS 1999: Studium der Chemie an der Universität Dortmund  
September 1999: Studienabschluß als Dipl.-Chem.  
Thema der Diplomarbeit: Charakterisierung der fluoreszenzspektroskopischen Eigenschaften des Fluorophors LAURDAN  
Oktober 1999: Beginn der Promotion am Lehrstuhl für Physikalische Chemie I von Prof. Dr. R. Winter

## Berufstätigkeit

Oktober 1999 – Mai 2004: Wissenschaftliche Hilfskraft  
Juni 2000 – März 2004: Wissenschaftlicher Angestellter